

UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**Processo de Cura Amarela do Bacalhau: Dinâmica de Populações
Microbianas, Indicadores Químicos e Descritores Sensoriais**

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR
EM ENGENHARIA ALIMENTAR

Susana Maria Pereira Dias

Orientador: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira

Co-orientador: Doutora Maria Leonor Martins Braz de Almeida Nunes

Júri

Presidente: Reitor da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Leonor Martins Braz de Almeida Nunes
Investigadora Principal
Instituto Português do Mar e da Atmosfera;

Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro,
Professor auxiliar com agregação
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa;

Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira,
Professor auxiliar com agregação
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Luísa Maria da Silva Pinto Ferreira,
Professora auxiliar
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa;

Doutora Maria José Ribeiro Machado Rodrigues,
Professora adjunta da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do
Mar do Instituto Politécnico de Leiria.

Agradecimentos

O presente estudo tornou-se possível graças ao apoio e colaboração de várias entidades e pessoas. Nesta fase, desejo expressar a minha sincera gratidão:

Ao senhor Professor Doutor Virgílio Loureiro por ter aceitado ser o meu orientador. Agradeço os importantes conselhos, sugestões, apoio científico fundamental, sentido crítico, experiência e incentivo que me ajudaram a levar a bom termo este projecto.

Mais do que agradecer a orientação relacionada com este estudo em concreto, quero agradecer-lhe todos os ensinamentos que me tem transmitido, ao longo do meu percurso académico e profissional, sempre de forma serena e autêntica.

Ao senhor Professor Manuel Malfeito Ferreira por ter aceitado a responsabilidade pela minha orientação na fase final deste projecto de doutoramento e por todo o apoio prestado.

À minha Co-orientadora Senhora Engenheira Maria Leonor Nunes por me ter recebido no IPIMAR (actual IPMA), disponibilizando recursos que me permitiram realizar trabalho laboratorial imprescindível. Agradeço a força, a disponibilidade, o apoio científico e humano, e sobretudo, os seus importantes conselhos.

Ao colega da ESAC Professor Doutor Rui Costa que, ao convidar-me para integrar o projecto MARE – inovação na indústria do bacalhau - foi o responsável pela minha entrada neste mundo apaixonante, que é o do estudo do “*fidel amigo*”, enquanto alimento.

Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro por me ter recebido na FC/UL/ICAT e facultado recursos, sem os quais teria sido muito difícil realizar trabalho laboratorial no âmbito da biologia molecular, bem como pela análise estatística dos resultados. Agradeço a forma jovial e simultaneamente profissional e rigorosa, com que sempre me aconselhou e ajudou no trabalho desenvolvido.

À Professora Doutora Lélia Chambel da FC/UL/ICAT, pela simpatia, disponibilidade e rigor, no apoio técnico e científico relacionado com a execução dos trabalhos laboratoriais de biologia molecular e análise de resultados no programa Bionumerics.

À Professora Doutora Luísa Ferreira da FCT/UNL por toda a disponibilidade de tempo e recursos, apoio, paciência e revisão crítica do estudo químico do pigmento amarelo do bacalhau de cura amarela.

À Doutora Amparo Gonçalves do IPMA, pela simpatia, paciência e amizade com que me apoiou cientificamente na análise sensorial.

Ao Sr. Paulo Timóteo da **Comimba** (Grupo Riber Alves), pela curiosidade, profissionalismo, disponibilidade, paciência e simpatia, que caracterizaram toda a sua inestimável colaboração na elaboração e acompanhamento do processo de cura do bacalhau, em ambiente industrial, por vezes à custa do seu tempo livre.

À **Lugrade**, em especial ao Dr. Vitor Lucas, que desde o primeiro momento demonstrou total abertura para participar activamente neste projecto de doutoramento. Um apoio que se traduziu no

fornecimento de amostras, apoio na implementação de processos experimentais em ambiente industrial e colaboração na análise sensorial.

Ao Sr. Eng. Ricardo Alves da **Riberalves**, pela colaboração neste estudo permitindo o fornecimento de amostras e execução de processos tecnológicos experimentais em espaço industrial.

À Doutora Conceição Egas da BIOCANT pela simpatia e disponibilidade sempre demonstradas no esclarecimento de dúvidas relacionadas com a pirosequenciação.

Às colegas da ESAC Professora Doutora Isabel Duarte e Professora Doutora Paula Amador pelo apoio na iniciação à bioinformática, essencial para a análise das sequenciações, bem como pela amizade e companheirismo.

Aos elementos do IPMA Dra. Susana Gonçalves, Sra. D. Margarida, Doutora Cláudia Afonso, Doutora Helena Lourenço, Sr. Manuel Pires, Doutora Maria Fernanda Martins por toda a ajuda prestada a nível técnico relativamente às análises físico-químicas; ao Engenheiro Irineu Batista, Doutora Carla Pires e Doutora Narcisa Bandarra, pela participação na avaliação sensorial.

À Sra. D. Rosa Barreto, Sra. D. Helena Marques, Sr. Fernando Couceiro, Eng^a Isabel Herder e Eng^o Heleno Abreu da ESAC, pela ajuda prestada, num ou noutra momento, sempre de forma afável.

A todos os colegas e amigos, que genuinamente me apoiaram no decorrer do doutoramento!

E por último e não menos importante, um agradecimento muito especial e muito particular aos 6 pilares que ajudaram a suportar o peso daqueles momentos menos bons, em que a adversidade, a falta de paciência, motivação e criatividade teimaram em imperar – obrigada família!

Aos meus pais

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da bolsa de investigação SFRH/ BD / 42241 / 2007, financiada por fundos nacionais do MCTES

Resumo

Foi demonstrado que o processo de cura amarela do bacalhau envolve actividade microbiana, ao contrário do que acontece no de cura branca, onde a carga microbiana é uma ou várias ordens de grandeza inferior.

A demolha do bacalhau salgado verde reduz cerca de 5% o teor de sal, favorecendo a actividade da microbiota presente. Após a subsequente secagem há aumento das bactérias proteolíticas, amonificantes e produtoras de trimetilamina, com o correspondente aumento do teor de azoto não proteico. O teor de amins biogénicas é sempre baixo, não sendo um risco de saúde pública.

As bactérias dominantes durante a cura amarela pertencem aos géneros *Staphylococcus*, *Psychrobacter*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas*, tendo sido estabelecida uma correlação positiva entre o teor de *Staphylococcus* e *Psychrobacter* e a concentração de ABVT e N-TMA.

Prolongar o período de cura não melhora as características sensoriais do produto final e, exceptuando a cor do bacalhau não demolhado, não houve diferenças sensoriais significativas para o de cura branca.

Não foi identificada a estrutura química do pigmento amarelo, mas foi confirmada a presença de anéis aromáticos, provavelmente provenientes de fenilalanina ou tirosina, sugerindo que a actividade microbiana proteolítica terá contribuído ou sido responsável pela coloração amarela do bacalhau.

Palavras-chave: bacalhau cura amarela; microbiota do bacalhau; grupos funcionais durante o processo de cura; características sensoriais bacalhau; pigmento amarelo.

TITLE: Yellow Codfish Curing Process: Dynamics of Microbial Population, Sensory Descriptors and Chemical Indicators

Abstract

It was demonstrated that yellow cure codfish involves a substantial microbial activity, contrasting with dry-salted-codfish (white-cure-codfish) which presents lower microorganisms level.

The salt content decreases during the salted-raw-codfish soaking, favouring the existing microorganisms activity. The subsequent drying step benefits proteolytic, amonifying and trimethylamine producing bacteria, with a corresponding non-protein-nitrogen content increase.

The biogenic amines do not represent a public health risk because of their low concentration in yellow cured product.

The dominant bacteria during yellow curing belong to the genera *Staphylococcus*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes* having been established a positive correlation between the content of *Staphylococcus* and *Psychrobacter* and TVB-N and N-TMA concentration.

To extend the ripening time does not seem to reflect significant differences yellow cured codfish sensory attributes and only the colour attribute allow differentiating the yellow cured codfish from dry-heavy-salted codfish

It was not identified the yellow pigment chemical structure but the presence of aromatic rings was confirmed, probably from phenylalanine or tyrosine, suggesting that the proteolytic microbial activity could contribute for the yellow colour biosynthesis of this kind of product.

Key Words: yellow cure codfish; microbiota of codfish; yellow cured codfish sensory attributes; microbial activity; yellow pigment

Índice Geral

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMENTOS | III |
| RESUMO | IX |
| ABSTRACT | XI |
| ÍNDICE GERAL | XIII |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | XV |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | XVIII |
| ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS | XX |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 1.1. APONTAMENTO HISTÓRICO | 7 |
| 1.2. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA DO BACALHAU | 15 |
| 1.3. BIOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO BACALHAU | 22 |
| 1.4. ASPECTOS TECNOLÓGICOS DE PROCESSAMENTO DO BACALHAU | 27 |
| 1.4.1. <i>Captura, sangria, descabeçamento, evisceração e escala.....</i> | <i>27</i> |
| 1.4.2. <i>Lavagem, salga e maturação.....</i> | <i>29</i> |
| 1.4.3. <i>Secagem e armazenamento</i> | <i>43</i> |
| 1.5. O PROCESSO DE CURA AMARELA | 46 |
| 1.5.1. <i>Secagem do bacalhau de cura amarela (Gaspé)</i> | <i>49</i> |
| 1.5.2. <i>Mecanismos bioquímicos e microbiológicos da cura amarela.....</i> | <i>53</i> |
| 1.6. MICROBIOLOGIA DO BACALHAU..... | 57 |
| 1.6.1. <i>Métodos de análise microbiológica</i> | <i>65</i> |
| | |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 2.1. MATÉRIA-PRIMA | 71 |
| 2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 71 |
| 2.2.1. <i>Estudo de cura amarela - Ensaio 1.....</i> | <i>71</i> |
| 2.2.2. <i>Evolução da população microbiana e dos parâmetros físico-químicas ao longo do processo de cura amarela em ambiente industrial - Ensaio 2.....</i> | <i>73</i> |
| 2.2.3. <i>Comparação entre o bacalhau de cura amarela e o bacalhau de cura branca - Ensaio 3.....</i> | <i>74</i> |
| 2.2.4. <i>Estudo da biodiversidade microbiana do bacalhau de cura branca e de cura amarela com base no método de sequenciação múltipla paralela de DNA - Ensaio 4</i> | <i>77</i> |
| 2.2.5. <i>Estudo da estabilidade microbiológica do bacalhau de cura amarela - Ensaio 5.....</i> | <i>79</i> |
| 2.2.6. <i>Purificação e caracterização química do pigmento presente no bacalhau de cura amarela - Ensaio 6</i> | <i>81</i> |
| 2.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA, NUTRICIONAL E SENSORIAL | 83 |
| 2.3.1. <i>Caracterização Microbiológica</i> | <i>83</i> |
| 2.3.2. <i>Indicadores físico-químicos.....</i> | <i>88</i> |
| 2.3.3. <i>Avaliação nutricional</i> | <i>89</i> |
| 2.3.4. <i>Determinação da cor</i> | <i>89</i> |
| 2.3.5. <i>Avaliação sensorial do bacalhau em cru e cozido.....</i> | <i>90</i> |
| 2.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO | 92 |
| | |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 95 |
| 3.1. ENSAIO 1: ESTUDO DE CURA AMARELA | 95 |
| 3.1.1. <i>Indicadores microbiológicos</i> | <i>95</i> |
| 3.1.2. <i>Indicadores físico-químicos.....</i> | <i>97</i> |
| 3.2. ENSAIO 2: EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA E DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AO LONGO DO PROCESSO DE CURA AMARELA EM AMBIENTE INDUSTRIAL | 99 |

| | | |
|------------------|--|------------|
| 3.2.1. | <i>Indicadores microbiológicos</i> | 99 |
| 3.2.2. | <i>Indicadores físico-químicos</i> | 110 |
| 3.3. | ENSAIO 3: COMPARAÇÃO ENTRE O BACALHAU DE CURA AMARELA E O BACALHAU DE CURA BRANCA | 114 |
| 3.3.1. | <i>Indicadores microbiológicos</i> | 114 |
| 3.3.2. | <i>Indicadores físico-químicos</i> | 121 |
| 3.3.3. | <i>Indicadores sensoriais</i> | 128 |
| 3.4. | ENSAIO 4: BIODIVERSIDADE MICROBIANA DO BACALHAU DE CURA BRANCA E DE CURA AMARELA COM BASE NO MÉTODO DE SEQUENCIAÇÃO MÚLTIPLA PARALELA DE DNA | 132 |
| 3.5. | ENSAIO 5: ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PRODUTO DE CURA AMARELA | 137 |
| 3.5.1. | <i>Indicadores microbiológicos</i> | 137 |
| 3.5.2. | <i>Indicadores físico-químicos</i> | 142 |
| 3.5.3. | <i>Indicadores sensoriais</i> | 147 |
| 3.6. | PERSPECTIVA INTEGRADA DOS RESULTADOS OBTIDOS | 154 |
| 3.6.1. | <i>Dinâmica populacional dos grupos funcionais de microrganismos do bacalhau, estudados ao longo do processo de cura</i> | 163 |
| 3.7. | PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PIGMENTO PRESENTE NO BACALHAU DE CURA AMARELA | 167 |
| 4. | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS | 181 |
| 5. | BIBLIOGRAFIA | 189 |
| ANEXO I | | 203 |
| ANEXO II | | 215 |
| ANEXO III | | 223 |
| ANEXO IV | | 233 |
| ANEXO V | | 233 |
| ANEXO VI | | 253 |
| ANEXO VII | | 257 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1.1 - PORMENOR DE PLANISFÉRIO, SÉCULO. XVI, MUSEU MARÍTIMO DE ÍLHAVO | 10 |
| FIGURA 1.2 - BACALHAU DO ATLÂNTICO (<i>GADHUS MORHUA</i>)..... | 22 |
| FIGURA 1.3 - DISTRIBUIÇÃO DO BACALHAU NO ATLÂNTICO NORTE..... | 23 |
| FIGURA 1.4 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL, HUMIDADE E PROTEÍNA SOLÚVEL, EM POSTAS DE BACALHAU IMERSAS EM SOLUÇÃO SATURADA DE CLORETO DE SÓDIO, A 0 °C. | 32 |
| FIGURA 1.5 – EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL E HUMIDADE NO MÚSCULO DO BACALHAU AO LONGO DA SALGA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SALMOURA. | 32 |
| FIGURA 1.6 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA POR DIFUSÃO E OSMOSE | 39 |
| FIGURA 1.7 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS NA SALMOURA AO LONGO DO PROCESSO DE CURA. | 40 |
| FIGURA 1.8 - VARIAÇÃO DO SAL (A) E DA HUMIDADE (B) NO LOMBO DE BACALHAU EM FUNÇÃO DO TEMPO E CONCENTRAÇÃO DA SALMOURA.) | 41 |
| FIGURA 1.9 - PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE BACALHAU TIPO “CURA BRANCA”, TIPO “NACIONAL” E TIPO “INGLÊS”, A PARTIR DA FASE COMUM DE LAVAGEM. | 48 |
| FIGURA 1.10 - CURVA DA PERDA DE ÁGUA, DURANTE A SECAGEM DO BACALHAU DE CURA GASPÉ, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA: HUMIDADE 55%; VELOCIDADE DE CIRCULAÇÃO DO AR 92 M/MIN. | 51 |
| FIGURA 1.11 - CURVA DA PERDA DE ÁGUA, DURANTE A SECAGEM DO BACALHAU DE CURA GASPÉ, EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE CIRCULAÇÃO DO AR: TEMPERATURA DE 26,7 °C; HUMIDADE 55% | 51 |
| FIGURA 1.12 - CURVA DA PERDA DE ÁGUA, DURANTE A SECAGEM DO BACALHAU DE CURA GASPÉ, EM FUNÇÃO DA HUMIDADE RELATIVA: TEMPERATURA DE 26,7 °C; VELOCIDADE DE CIRCULAÇÃO DO AR 92 M/MIN. | 52 |
| FIGURA 2.1 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO EXPERIMENTAL REALIZADO (L,R: EMPRESAS FORNECEDORAS DOS PEIXES ANALISADOS NOS ENSAIOS). | 71 |
| FIGURA 2.2 – PEDAÇOS DE BACALHAU NUMA CÂMARA DE TEMPERATURA E HUMIDADE CONTROLADAS, DURANTE A FASE DE MATURAÇÃO A UMA HUMIDADE AMBIENTE DE 75%. O CÍRCULO BRANCO INDICA A REIMA QUE SE FORMOU. | 72 |
| FIGURA 2.3 - DIAGRAMA DE PREPARAÇÃO LABORATORIAL DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM HUMIDADE DE MATURAÇÃO DE 70%. (ENXUGO TERMO USADO NA INDÚSTRIA NO SENTIDO DE ESCORRIMENTO)..... | 72 |
| FIGURA 2.4 - DIAGRAMA DO ESTUDO LABORATORIAL DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM HUMIDADE DE MATURAÇÃO DE 75% E DEPOIS DE 70%. | 73 |
| FIGURA 2.5 - DIAGRAMA DOS PROCESSOS DE PREPARAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA SEGUIDOS NAS EMPRESAS R E L. (*ENXUGO COM EMPILHAMENTO)..... | 74 |
| FIGURA 2.6 - DIAGRAMA DA PREPARAÇÃO DO BACALHAU DE CURA BRANCA PELAS EMPRESAS L E R. | 75 |
| FIGURA 2.7 - DIAGRAMAS DA PREPARAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA PELA EMPRESA R E L (* PRENSAGEM 170 KG/M ² ; ** COM EMPILHAMENTO) | 75 |
| FIGURA 2.8 – ASPECTO TÍPICO DE UM BACALHAU DE CURA BRANCA (A) E DE UM BACALHAU DE CURA AMARELA (B). | 76 |
| FIGURA 2.9 - ESQUEMA DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BACALHAU, PARA AS DIFERENTES ANÁLISES. | 77 |
| FIGURA 2.10 - DIAGRAMA DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DOS PEIXES DE CURA AMARELA DO ENSAIO 5..... | 80 |
| FIGURA 2.11 - ESQUEMA DE UTILIZAÇÃO DE CADA PEIXE PARA AS DIFERENTES ANÁLISES. | 81 |
| FIGURA 2.12 – AMOSTRA L5: BACALHAU DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL) TRITURADO E HOMOGENEIZADO. | 82 |
| FIGURA.2.13 - ESQUEMA DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS: QUANTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS PELA TÉCNICA DOS TUBOS MÚLTIPLOS (AS CORES INDICADAS NÃO CORRESPONDEM ÀS CORES REAIS DOS MEIOS DE CULTURA) | 84 |
| FIGURA 2.14 - SALA DE ANÁLISE SENSORIAL ONDE FOI EFECTUADA A AVALIAÇÃO ORGANOLÉPTICA DO BACALHAU | 90 |
| FIGURA. 2.15 - AVALIAÇÃO SENSORIAL DO BACALHAU EM CRU | 91 |
| FIGURA 3.1 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS FUNCIONAIS AO LONGO DO PROCESSO LABORATORIAL DE CURA COM HUMIDADE CONTROLADA DE 70%..... | 96 |
| FIGURA 3.2 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS FUNCIONAIS AO LONGO DO PROCESSO LABORATORIAL DE CURA COM HUMIDADE CONTROLADA DE 75% ATÉ AO FIM DA 1ª SEMANA E DE 70% A PARTIR DA 2ª SEMANA..... | 96 |
| FIGURA 3.3 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE DO PEIXE AO LONGO DO PROCESSO LABORATORIAL DE CURA..... | 97 |
| FIGURA 3.4 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE CLORETO DO BACALHAU AO LONGO DO PROCESSO LABORATORIAL DE CURA. | 97 |
| FIGURA 3.5 - EVOLUÇÃO DE A _w DO BACALHAU AO LONGO DO PROCESSO LABORATORIAL DE CURA. | 98 |
| FIGURA 3.6 - EVOLUÇÃO DE PH DO BACALHAU AO LONGO DO PROCESSO LABORATORIAL DE CURA..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 3.7 - EVOLUÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS DE BACTÉRIAS DURANTE O PROCESSO DE CURA (INDÚSTRIA R). LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS DE UM MESMO GRUPO FUNCIONAL INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS DE CADA ETAPA ($P > 0,05$). | 100 |
| FIGURA 3.8 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS DE BACTÉRIAS DURANTE O PROCESSO DE CURA (INDÚSTRIA L). LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS DE UM MESMO GRUPO FUNCIONAL INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS DE CADA ETAPA ($P > 0,05$). | 100 |
| FIGURA 3.9 - DENDROGRAMA BASEADO NO PCR FINGERPRINTING DAS ESTIRPES GRAM – ISOLADAS A PARTIR DAS DIFERENTES FASES DE ELABORAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA (A IDENTIFICAÇÃO ATÉ AO NÍVEL DE GÊNERO INDICADA FOI OBTIDA PELA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S R DNA). A FASE DE SEGUNDA SECAGEM CORRESPONDE AO PRODUTO FINAL. | 105 |
| FIGURA 3.10 - DENDROGRAMA BASEADO NO PCR FINGERPRINTING DAS ESTIRPES GRAM + ISOLADAS A PARTIR DAS DIFERENTES FASES DE ELABORAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA (A IDENTIFICAÇÃO ATÉ AO NÍVEL DE GÊNERO INDICADA FOI OBTIDA PELA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S rDNA). | 108 |
| FIGURA 3.11 - EVOLUÇÃO DO PH AO LONGO DO PROCESSO DE CURA NA INDÚSTRIA R; AS LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS INDICAM QUE NÃO EXISTEM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS ($P > 0,05$). | 111 |
| FIGURA 3.12 - EVOLUÇÃO DO TEOR EM HUMIDADE E DE CLORETOS AO LONGO DO PROCESSO DE CURA NAS INDÚSTRIAS R; AS LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS INDICAM QUE NÃO EXISTEM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS ($P > 0,05$). | 111 |
| FIGURA 3.13 - EVOLUÇÃO DO TEOR EM HUMIDADE E DE CLORETOS AO LONGO DO PROCESSO DE CURA NAS INDÚSTRIAS L; AS LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS INDICAM QUE NÃO EXISTEM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS ($P > 0,05$). | 111 |
| FIGURA 3.14 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE ABVT E N-TMA AO LONGO DO PROCESSO DE CURA NA INDÚSTRIA R | 112 |
| FIGURA 3.15 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE ABVT E N-TMA AO LONGO DO PROCESSO DE CURA NA INDÚSTRIA L | 113 |
| FIGURA 3.16 - COMPOSIÇÃO EM TERMOS DE GRUPOS BACTERIANOS FUNCIONAIS DAS AMOSTRAS DE BACALHAU SALGADO VERDE, DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL OBTIDO AO FIM DE 3 SEMANAS), E DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL COM MATURAÇÃO DE 3 MESES), EM CRU. | 115 |
| FIGURA 3.17 - DENDROGRAMA BASEADO NO PCR FINGERPRINTING DAS ESTIRPES GRAM - ISOLADAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA TRADICIONAL, CURA AMARELA 3 SEMANAS, CURA AMARELA 3 MESES (A IDENTIFICAÇÃO ATÉ AO NÍVEL DE GÊNERO, INDICADA FOI OBTIDA PELA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S rDNA). | 119 |
| FIGURA 3.18 - DENDROGRAMA BASEADO NO PCR FINGERPRINTING DAS ESTIRPES GRAM + ISOLADAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, CURA AMARELA 3 SEMANAS, CURA AMARELA 3 MESES (A IDENTIFICAÇÃO ATÉ AO NÍVEL DE GÊNERO INDICADA FOI OBTIDA PELA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S rDNA). | 120 |
| FIGURA 3.19 - TEOR DE HUMIDADE DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, BACALHAU DE CURA AMARELA E BACALHAU DE CURA AMARELA COM MATURAÇÃO DE 3 MESES, EM CRU E DEMOLHADO. | 122 |
| FIGURA 3.20- TEOR EM CLORETOS E ABVT DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, BACALHAU DE CURA AMARELA E BACALHAU DE CURA AMARELA COM MATURAÇÃO DE 3 MESES. | 122 |
| FIGURA 3.21 - TEOR DE N DE AMINOÁCIDOS LIVRES (AA LIVRES) E DE N-TMA DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, BACALHAU DE CURA AMARELA E BACALHAU DE CURA AMARELA COM MATURAÇÃO DE 3 MESES. | 122 |
| FIGURA 3.22 - TEOR DE GORDURA DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, BACALHAU DE CURA AMARELA E BACALHAU DE CURA AMARELA COM MATURAÇÃO DE 3 MESES, EM CRU E DEMOLHADO. | 125 |
| FIGURA 3.23 - TEOR DE PROTEÍNA DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, BACALHAU DE CURA AMARELA E BACALHAU DE CURA AMARELA COM MATURAÇÃO DE 3 MESES, EM CRU E DEMOLHADO. | 125 |
| FIGURA 3.24 - TEOR DE CINZA DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, BACALHAU DE CURA AMARELA E BACALHAU DE CURA AMARELA COM MATURAÇÃO DE 3 MESES, EM CRU E DEMOLHADO. | 125 |
| FIGURA 3.25 - COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS L*, A*, B* APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL OBTIDO AO FIM DE 3 SEMANAS), E DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL COM MATURAÇÃO DE 3 MESES), EM CRU E DEMOLHADAS. | 128 |
| FIGURA 3.26 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM A COR DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL OBTIDO AO FIM DE 3 SEMANAS), E DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL COM CURA SUPLENTE DE 3 MESES), EM CRU E EM COZIDO. | 130 |
| FIGURA 3.27 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O CHEIRO DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL OBTIDO AO FIM DE 3 SEMANAS), E DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL COM CURA SUPLENTE DE 3 MESES), EM CRU E EM COZIDO. | 130 |
| FIGURA 3.28 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O ASPECTO DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL OBTIDO AO FIM DE 3 SEMANAS), E DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL COM CURA SUPLENTE DE 3 MESES), EM CRU E EM COZIDO. | 131 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 3.29- AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O SABOR DAS AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL OBTIDO AO FIM DE 3 SEMANAS), E DE CURA AMARELA (PRODUTO FINAL COM CURA SUPLENTE DE 3 MESES), EM COZIDO..... | 132 |
| FIGURA 3.30 - DENDROGRAMA FILOGENÉTICO COM OS GRUPOS TAXONÓMICOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS ANALISADAS. AS BARRAS CORRESPONDEM AO NÚMERO DE UTO DETERMINADAS OS CÍRCULOS REPRESENTAM A DISTRIBUIÇÃO DE UTO DOS MAIS ELEVADOS “RANKINGS” VERMELHO (BACALHAU CURA BRANCA), VERDE (BACALHAU CURA AMARELA 3 SEMANAS), AZUL (BACALHAU CURA AMARELA 3 MESES DE MATURAÇÃO)..... | 133 |
| FIGURA 3.31 - GRÁFICO COMPARATIVO DOS GRUPOS TAXONÓMICOS IDENTIFICADOS NAS DIFERENTES AMOSTRAS ANALISADAS PELO MÉTODO DE PIROSEQUENCIAÇÃO DO DNA TOTAL E PELA SEQUENCIAÇÃO 16S rDNA DE ESTIRPES GRAM - ISOLADAS..... | 135 |
| FIGURA 3.32 - GRÁFICO COMPARATIVO DOS GRUPOS TAXONÓMICOS IDENTIFICADOS NAS DIFERENTES AMOSTRAS ANALISADAS PELO MÉTODO DE PIROSEQUENCIAÇÃO DO DNA TOTAL E PELA SEQUENCIAÇÃO 16S rDNA DE ESTIRPES GRAM + ISOLADAS..... | 136 |
| FIGURA 3.33 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS FUNCIONAIS AO LONGO DO PROCESSO DE CURA: AT (AERÓBIOS TOTAIS); BH (BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA); BTMA (BACTÉRIAS PRODUTORAS DE TRIMETILAMINA); B H ₂ S (BACTÉRIAS SULFITO-REDUTORAS/CRESCIMENTO EM IRON AGAR); BP (BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS); B ARGD (BACTÉRIAS DESCARBOXILADORAS DE L-ARGININA) | 138 |
| FIGURA 3.34 - DENDROGRAMA BASEADO NO PCR FINGERPRINTING DAS ESTIRPES GRAM - ISOLADAS A PARTIR DAS DIFERENTES FASES DE ELABORAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA. | 140 |
| FIGURA 3.35 - DENDROGRAMA BASEADO NO PCR FINGERPRINTING DAS ESTIRPES GRAM + ISOLADAS A PARTIR DAS DIFERENTES FASES DE ELABORAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA. | 141 |
| FIGURA 3.36 - EVOLUÇÃO DA HUMIDADE AO LONGO DO PROCESSO DE CURA E PUTREFACTÃO DO PRODUTO.. | 142 |
| FIGURA 3.37 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE CLORETOS AO LONGO DO PROCESSO DE CURA E PUTREFACTÃO DO PRODUTO..... | 143 |
| FIGURA 3.38 - EVOLUÇÃO DO PH AO LONGO DO PROCESSO DE CURA E PUTREFACTÃO DO PRODUTO..... | 143 |
| FIGURA 3.39 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE AZOTO BÁSICO VOLÁTIL AO LONGO DO PROCESSO DE CURA E PUTREFACTÃO DO PRODUTO. | 144 |
| FIGURA 3.40 - EVOLUÇÃO DE N-TMA AO LONGO DO PROCESSO DE CURA E PUTREFACTÃO DO PRODUTO. | 144 |
| FIGURA 3.41 - EVOLUÇÃO DO TEOR DE AZOTO DOS AMINOÁCIDOS LIVRES AO LONGO DO PROCESSO DE CURA E PUTREFACTÃO DO PRODUTO. | 144 |
| FIGURA 3.42 – ASPECTO TÍPICO DE UM BACALHAU DE CURA AMARELA NO FINAL DA PRIMEIRA SECAGEM. | 148 |
| FIGURA 3.43 – ASPECTO DE UM BACALHAU DE CURA AMARELA EM PUTREFACTÃO: R – REIMA; E – EMPOADO..... | 148 |
| FIGURA 3.44- COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS L*, A*, B* APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU AO LONGO DO PROCESSO DE CURA, NO PRODUTO FINAL E NO PRODUTO EM PUTREFACTÃO..... | 149 |
| FIGURA 3.45 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O CHEIRO, APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU EM CRU, PROVENIENTES DE DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CURA, DO PRODUTO FINAL E DO PRODUTO EM PUTREFACTÃO.. | 151 |
| FIGURA 3.46 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM A COR APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU EM CRU, PROVENIENTES DE DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CURA, DO PRODUTO FINAL E DO PRODUTO EM PUTREFACTÃO. | 151 |
| FIGURA 3.47 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O ASPETO APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU EM CRU, PROVENIENTES DE DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CURA, DO PRODUTO FINAL E DO PRODUTO EM PUTREFACTÃO. | 152 |
| FIGURA 3.48 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O CHEIRO APRESENTADOS POR AMOSTRAS COZIDAS DE BACALHAU PROVENIENTES DE DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CURA, DO PRODUTO FINAL E DO PRODUTO EM PUTREFACTÃO. | 152 |
| FIGURA 3.49 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM A COR/ASPECTO APRESENTADOS POR AMOSTRAS COZIDAS DE BACALHAU PROVENIENTES DE DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CURA, DO PRODUTO FINAL E DO PRODUTO EM PUTREFACTÃO. | 153 |
| FIGURA 3.50 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS RELACIONADOS COM O SABOR APRESENTADOS POR AMOSTRAS COZIDAS DE BACALHAU PROVENIENTES DE DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CURA, DO PRODUTO FINAL E DO PRODUTO EM PUTREFACTÃO. | 154 |
| FIGURA 3.51 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS FUNCIONAIS AO LONGO DO PROCESSO DE CURA, NOS DIFERENTES ENSAIOS:..... | 155 |
| FIGURA 3.52 – DIAGRAMA BI-FACTORIAL (DIM 1 E DIM 2) DE PROJEÇÃO OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS BASEADA EM RESULTADOS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS MICROBIANOS, GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, NAS DIFERENTES FASES DA CURA AMARELA E PUTREFACTÃO: | 156 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 3.53 - DIAGRAMA BI-FACTORIAL (DIM 1 E DIM 3) DE PROJEÇÃO OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS BASEADA EM RESULTADOS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS MICROBIANOS, GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, NAS DIFERENTES FASES DA CURA AMARELA E PUTREFAÇÃO: | 157 |
| FIGURA 3.54 – DIAGRAMA TRIDIMENSIONAL (DIM 1, DIM 2 E DIM3) CORRESPONDENTE À ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS BASEADA EM RESULTADOS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS MICROBIANOS, GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, NAS DIFERENTES FASES DA CURA AMARELA E PUTREFAÇÃO: | 158 |
| FIGURA 3.55 - DIAGRAMA BI-FACTORIAL (DIM 1 E DIM 2) DE PROJEÇÃO OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS BASEADA EM RESULTADOS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS MICROBIANOS, GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS, PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS NO BACALHAU DE CURA BRANCA (E2 CB), CURA AMARELA 3 SEMANAS (E2 CA_3S) E CURA AMARELA 3 MESES (E2 CA_3M). | 160 |
| FIGURA 3.56 - DIAGRAMA BI-FACTORIAL (DIM 1 E DIM 2) DE PROJEÇÃO OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS BASEADA EM RESULTADOS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS MICROBIANOS, GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS, PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS, NA TERCEIRA SECAGEM/PRODUTO FINAL (E3 PF), INÍCIO PUTREFAÇÃO (E3 IP) E PUTREFAÇÃO (E3 P). | 161 |
| FIGURA 3.57 – DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DOS GÊNEROS BACTERIANOS DOMINANTES NO BACALHAU AO LONGO DO PROCESSO DE CURA AMARELA E DETERIORAÇÃO PROVOCADA (GF: GRUPO FUNCIONAL DE BACTÉRIAS; BAT: BACTÉRIAS AERÓBIAS TOTAIS; BP: BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS; BTMA: BACTÉRIAS PRODUTORAS DE TRIMETILAMINA; BH: BACTÉRIAS SULFITORREDUTORAS. | 164 |
| FIGURA 3.58 – DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DOS GÊNEROS BACTERIANOS DOMINANTES NO BACALHAU AO LONGO DO PROCESSO DE CURA BRANCA (GF: GRUPO FUNCIONAL DE BACTÉRIAS; BAT: BACTÉRIAS AERÓBIAS TOTAIS; BTMA: BACTÉRIAS PRODUTORAS DE TRIMETILAMINA) | 166 |
| FIGURA 3.59 - ESPECTRO ¹ H RMN DA AMOSTRA LB5 A..... | 167 |
| FIGURA 3.60 - ESPECTRO ¹ H RMN DA AMOSTRA LB4 A..... | 168 |
| FIGURA 3.61 - ESPECTRO ¹³ CRMN DA AMOSTRA LB5A. | 168 |
| FIGURA 3.62 - ESPECTRO ¹³ CRMN DA AMOSTRA LB4. | 169 |
| FIGURA 3.63 - ESPECTRO DEPT DA AMOSTRA LB5A..... | 169 |
| FIGURA 3.64 - ESPECTRO DEPT DA AMOSTRA LB4A..... | 170 |
| FIGURA 3.65 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE ANÁLISE HMQC DA AMOSTRA LB5A. | 170 |
| FIGURA 3.66 - ESPECTRO DE ANÁLISE HMQC DA AMOSTRA LB4A..... | 171 |
| FIGURA 3.67 – ESPECTRO DE MASSA DE LB4A..... | 172 |
| FIGURA 3.68 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA LB4 A. | 173 |
| FIGURA. 3.69 - ESPECTRO DE MASSA DE LB5A. | 173 |
| FIGURA. 3.70 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA LB5 A. | 174 |
| FIGURA. 3.71 - PRODUTOS DE INTERAÇÃO ENTRE CISTEÍNA E ALDEÍDOS, E ENTRE UMA BASE DE SCHIFF E LISINA COMBINADO (ADAPTADO DE: POKORNÏ, 1981). | 176 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|-----|
| TABELA 1.1 CARACTERÍSTICAS DE HUMIDADE E TEOR DE SAL DO BACALHAU SALGADO VERDE, SALGADO SECO E DE CURA AMARELA (FONTES: (1) DECRETO LEI Nº 25/2005 DE 28 DE JANEIRO; (2) THORARINSDOTTIR, 2010)..... | 47 |
| TABELA 1.2 – MICROBIOTA DO BACALHAU FRESCO, SALGADO, SALGADO SECO E DEMOLHADO. | 58 |
| TABELA 1.3 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA A ESTIMATIVA DA CARGA MICROBIANA EM PEIXE (ADAPTADO DE HUSS, 1995). ... | 65 |
| TABELA 3.1 - CARACTERIZAÇÃO EXPEDITA DAS ESTIRPES SELECIONADAS, POR GRUPO FUNCIONAL, SEGUNDO A FASE DO PROCESSO..... | 102 |
| TABELA 3.2 - CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DAS ESTIRPES SELECIONADAS. * | 103 |
| TABELA 3.3 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES ISOLADAS SEGUNDO O PROCESSO DE CURA E GRUPO FUNCIONAL. | 115 |
| TABELA 3.4 – TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS DETERMINADOS EM AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA AMARELA, NO PRODUTO FINAL PRONTO PARA COMERCIALIZAR E NO PRODUTO COM MAIS TEMPO DE MATUREZAÇÃO. | 124 |
| TABELA 3.5 - VALORES MÉDIOS DE MG, K E NA DO BACALHAU DE CURA BRANCA, DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM 3 SEMANAS E DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM 3 MESES DE MATUREZAÇÃO. AS LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS INDICAM QUE NÃO EXISTEM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS (P > 0,05). | 127 |
| TABELA 3.6 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES ENERGÉTICOS DO BACALHAU DE CURA BRANCA, DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM 3 SEMANAS E DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM 3 MESES DE MATUREZAÇÃO, EM CRU (OU SEJA CURADO NÃO DEMOLHADO) E DEMOLHADO. | 128 |
| TABELA 3.7 - COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMA E BRANCURA APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA BRANCA, DE CURA AMARELA 3 SEMANAS E DE CURA AMARELA COM 3 MESES DE MATUREZAÇÃO, EM CRU E DEMOLHADO. AS | |

| | |
|--|-----|
| LETRAS DIFERENTES JUNTO AOS VALORES MÉDIOS INDICAM QUE EXISTEM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS ($p < 0,05$)..... | 129 |
| TABELA 3.8 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES ISOLADAS SEGUNDO A FASE DO PROCESSO E GRUPO FUNCIONAL. | 139 |
| TABELA 3.9 – AMINAS BIOGÉNICAS EM AMOSTRAS DE BACALHAU DE DUAS DIFERENTES INDÚSTRIAS FORNECEDORAS (L E R), AO LONGO DO PROCESSAMENTO, ATÉ UM ESTADO DE PUTREFAÇÃO..... | 146 |
| TABELA 3.10 - COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMA E BRANCURA APRESENTADOS POR AMOSTRAS DE BACALHAU DE CURA AMARELA AO LONGO DO PROCESSO E AQUANDO DA PUTREFAÇÃO. AS LETRAS IGUAIS JUNTO AOS VALORES MÉDIOS INDICAM QUE NÃO EXISTEM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE AS AMOSTRAS ($p > 0,05$)..... | 150 |

Abreviaturas e Acrónimos

| | |
|-------------------|--|
| ABVT | Azoto básico volátil total |
| AIB | Associação dos Industriais do Bacalhau |
| API | <i>Analytical Profile Index</i> |
| AT | Aeróbios totais |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| Baf | Bactérias amonificantes |
| BH | Bactérias produtoras de histamina |
| BH ₂ S | Bactérias sulfitorredutoras |
| BLA | Bactérias lácticas |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BTMA | Bactérias produtoras de trimetilamina |
| CCD | <i>Charge- Coupled Device</i> (dispositivo de carga acoplada) |
| CIE | Comissão Internacional da Iluminação |
| CRCB | Comissão Reguladora do Comércio de Bacalhau |
| DEFT | Técnica de epifluorescência directa |
| DEPT | <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico) |
| dNTPs | Didesoxirribonucleótidos |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético) |
| ESI | Ionização por electrospray |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization</i> |
| FCT/UNL | Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa |
| ICES | Conselho Internacional para a Exploração do Mar |
| INE | Instituto Nacional de Estatística |
| INSA | Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge |
| IPQ | Instituto Português da Qualidade |
| HMBC | <i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i> (detecção de correlações heteronucleares) |
| HMQC | <i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i> (correlaciona prótons com os átomos de carbono “vizinhos”) |
| HPLC | <i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) |
| MRS | <i>Man Rogosa and Sharp</i> (meio de cultura para bactérias lácticas) |
| NAFO | Organização de Pescas do Atlântico Noroeste |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |

| | |
|----------|---|
| NMP | Número Mais Provável |
| NP | Norma Portuguesa |
| N-TMA | Azoto de trimetilamina |
| OTMA | Oxido de trimetilamina |
| Pb | Pares de bases |
| PCA | <i>Principal component Analysis</i> (Análise em Componentes Principais) |
| PCA© | <i>Plate Count Agar</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Reacção em cadeia da polimerase) |
| PTP | <i>Pico titer plate</i> |
| RGB | <i>Red Green Blue</i> |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| TAC | Total admissível de capturas |
| Taq | Enzima DNA polimerase extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris/Borate/EDTA |
| TMA | Trimetilamina |
| UFC | Unidades Formadoras de Colónias |
| UMA | Unidade de massa atómica |
| UTO | <i>Operational Taxonomic Units</i> (Unidade Taxonómica Operacional) |
| UV | Ultra Violeta |
| 16S rRNA | Gene do DNA bacteriano que codifica a subunidade 16S do ribossoma celular |

*Os dórís afastam-se à vela, a remos. .cada pescador:- agora sim :
«do meu dóri sou eu o capitão , aqui mando eu» - procura o local de
pesca por instinto , vai à sua sorte , ninguém interfere na sua escolha*

Francisco Correia Marques,
A pesca do Bacalhau, Oceanos – Terra Nova,
A epopeia do bacalhau, 2001

1. INTRODUÇÃO

O bacalhau (*Gadus morhua*), é um produto muito apreciado em Portugal devido ao peso da tradição, à especificidade das características organolépticas, à facilidade de conservação e ao papel da gastronomia.

Para tais atributos concorrem os processos de salga e de secagem que foram sucessivamente melhorados ao longo do tempo.

Inicialmente pescado pelos Vikings e posteriormente, por muitos outros povos do Atlântico Norte, permanece, ainda hoje, como um dos produtos mais importante para a economia da Islândia e Noruega, como “produtores”, e para a de Portugal e Espanha, como principais importadores, onde o bacalhau salgado é submetido a secagem industrial.

Este produto salgado seco (também designado de cura branca) é colocado no mercado, geralmente, sem ser embalado. O *flavour*¹ particular e a sua textura tornam-no um produto alimentar altamente apreciado, particularmente em países da Europa do Sul. Devido ao seu elevado teor de sal no músculo, o bacalhau salgado seco tem de ser reidratado, pelo menos durante 48 horas antes do consumo, procedimento pouco compatível com as tendências actuais em que se procuram alimentos de rápida confecção. Para ultrapassar este inconveniente têm vindo a ser comercializados produtos demolhados e /ou ultracongelados. Contudo, a rehidratação industrial, que ocorre com a demolha, reúne as condições favoráveis à actividade bacteriana: elevada actividade da água (a_w), e baixa concentração de sal, 2-4% (w/w) de NaCl, no produto (Bjorkevoll *et al.*, 2002).

Neste contexto, um produto seco, com menor teor de sal, flavor extremamente agradável e uma textura única, como o que se consegue pela cura amarela, leva os apreciadores a pagar um preço muito superior, constituindo um nicho de mercado para a indústria.

A cura amarela, também denominada cura Gaspé, é um processo antigo, característico da Península de Gaspé (Canadá), onde é favorecido pelas condições climatéricas, de ventos

¹ A palavra portuguesa correcta é flavor, correspondendo simultâneamente ao aroma olfactivo e aroma palatal.

de Nor-Nordeste combinados com temperatura de 22 °C e humidade relativa de 80%. Conduz à obtenção de um bacalhau menos salgado, que contém entre 14 e 18% de sal no produto final seco (Klaveren e Legendre, 1965).

São raras as referências científicas a este processo e a maior parte das descrições é de carácter artesanal, sugerindo que os industriais o entendem como um “segredo bem guardado”.

Klaveren e Legendre (1965) e Dussault (1953), são dos raros autores que estudaram o bacalhau de cura amarela. Os primeiros debruçaram-se sobre o processo tecnológico, mais concretamente sobre as condições de salga e de secagem natural e/ou artificial mais propícias. O segundo estudou a flora bacteriana da superfície do bacalhau de cura amarela e, com base nos resultados obtidos, associou a afinação do aroma e sabor característicos do bacalhau de cura amarela aos micrococos.

Todavia, tanto quanto se sabe, não existem estudos microbiológicos mais aprofundados que contemplem o músculo do bacalhau e a dinâmica microbiana no decurso do processo, reconhecendo-se a necessidade de ampliar conhecimentos relativos a este processo de cura. Este conhecimento contribuirá para compreender e controlar melhor o processo, mantendo ou melhorando as características organolépticas, e particularmente diminuindo o risco de deterioração inerente ao facto de se usar menos sal, do que no processo de cura branca.

O facto do bacalhau de cura amarela apresentar um aroma algo “desagradável”, sempre que a cura não é bem controlada, sugere que o processo de cura esteja na interface conservação/deterioração, que é preciso compreender em termos microbiológicos.

Actualmente, a quantidade de peixe processada desta forma no nosso país ainda é reduzida e sazonal. Tratando-se de um processo essencialmente empírico, exigente em termos de mão-de-obra experiente, o risco de deterioração é elevado. No entanto, é um produto com procura crescente, sobretudo em épocas festivas, e reconhecido por especialistas na área da culinária, como um alimento de grande qualidade do ponto de vista sensorial.

Objectivos

O presente estudo teve por objectivo fundamental aprofundar o conhecimento da população microbiana presente ao longo do processo de cura amarela, de forma a encontrar resposta para as seguintes perguntas:

1. A cura amarela implica, no todo ou em parte, a actividade microbiana de grupos funcionais microbianos?
2. Em caso de resposta afirmativa à primeira pergunta, qual ou quais os grupos funcionais envolvidos?
3. A cura amarela permite obter um produto final com características comerciais e/ou organolépticas superiores ao de cura branca?
4. O bacalhau de cura amarela envolve riscos para a saúde do consumidor, nomeadamente pela presença de amins biogénicas e ou presença de espécies patogénicas?
5. A pigmentação amarela do bacalhau resulta, directa ou indirectamente, da actividade microbiana?
6. Qual a natureza química do pigmento amarelo?

A resposta às perguntas referidas permitirá intervir a nível do processo tecnológico, nomeadamente através do estabelecimento de indicadores microbiológicos, físico-químicos e sensoriais, que tornarão a cura amarela um processo cientificamente controlável e não, como ainda acontece actualmente, um processo artesanal baseado no empirismo.

1.1. Apontamento histórico

A história do bacalhau como alimento perde-se no tempo. Envolve diversos países incutindo-se na sua alma e cultura, constituindo um fio condutor de modos de vida, alterações socioeconómicas e uma presença constante nos retratos de época.

Este peixe começou a ser pescado em quantidade significativa a partir do século IX, inicialmente nas zonas costeiras da Noruega (Correia, 1950). No século X já havia pescarias estabelecidas ao redor da Islândia e foi daqui que partiram os primeiros colonos em 986 para a Gronelândia, (Terra Verde - Groenlândia), descoberta pelo navegador EriK le Roux no ano de 981. A partir da Gronelândia, os seus descendentes chegaram à “Terra da Madeira” e à “Terra da Vinha”, provavelmente correspondentes às actuais “Terra Nova” ou “Nova Escócia”. Para garantir o sustento durante as expedições, recorria-se ao bacalhau conservado. Esta conservação era obtida pendurando-o ao ar invernoso e gélido até que perdesse 4/5 do seu peso e se convertesse numa prancha resistente que parecia madeira e que podia ser cortada e mastigada, como pão duro (Kurlansky, 2000).

Logo após estas descobertas, os Vikings instalaram-se nas novas terras, que mantiveram colonizadas por alguns séculos, como cantam as Sagas Escandinavas e provam os achados arqueológicos (Hiller, 1998; Kurlansky, 2000).

Os Vikings foram o primeiro povo a secar o bacalhau. No século IX já construíam instalações para tratar o bacalhau seco na Islândia e Noruega e vendiam os excedentes na Europa do Norte. Foram ainda os Vikings, de origem sueca, os responsáveis pela divulgação deste peixe a leste. Partindo do Golfo de Riga, foram fundar Kiev em 862, e seguindo os grandes rios como o Dniepre desembocaram no Mar Negro e daí passaram ao Mediterrâneo. O circuito de comercialização do bacalhau pôde assim, completar o périplo da Europa (Aveiro, 2009)

Pescadores franceses – Normandos e Bretões –introduziram esta pesca no mar da Mancha ou Mar Britânico, como era denominado, e no Golfo da Gasconha, onde nos séculos XI e XII atingiu um desenvolvimento considerável. Tal facto foi possível devido às condições climáticas, que subsistiam na altura que sofreram posteriormente alterações (Correia, 1950).

Durante a Idade Média, os Europeus consumiam elevadas quantidades de carne de baleia. Um dos povos que mais contribuía para o suplemento desta carne na Europa era o povo Basco, que empreendia longas viagens até à Gronelândia e Terra Nova para a obter. Tal pesca só era possível graças à abundância de bacalhau nestas paragens, que capturavam e salgavam, garantindo alimento durante estas longas jornadas (Kurlansky, 2000).

O mercado do bacalhau, foi desenvolvido por este povo, sendo que, por volta do ano 1000 já chegava muito além do habitat setentrional deste peixe. Isto porque, ao contrário dos Vikings, tinham sal e o peixe salgado antes de ser seco, durava muito mais tempo. Esta técnica, baseada na salga utilizada na carne de baleia, pelos pescadores Bascos, teve um enorme sucesso em termos de conservação, devido ao facto do bacalhau não apresentar muita gordura (Kurlansky, 2000).

Segundo Moutinho (1985), já por volta do século. X, os povos do Norte vinham abastecer-se de sal a Portugal, em particular a Setúbal. O sal já era explorado e utilizado anteriormente, pelo menos desde a ocupação romana, como provam as instalações apropriadas para este fim, cujas ruínas são ainda hoje visíveis.

O mesmo autor refere que também a norte de Portugal, na área de Fão, existiam salinas importantes, que chegaram a ser alvo de legislação por parte de D. Afonso Henriques, concedendo o dízimo aos frades do convento de N^a Sra. da Atalaia. O comércio do sal efectuava-se então, pelo porto de Fão que formava um excelente abrigo natural para os barcos.

As salinas portuguesas tiveram um papel preponderante no fornecimento de sal à Europa, pela sua quantidade e qualidade, só perdido mais tarde, quando as salinas da Flandres foram abertas a este comércio (Moutinho,1985).

Na Idade Média os rituais católicos impunham a proibição do consumo de carne em quase metade dos dias do ano, permitindo contudo, a ingestão de comidas “frias”. Dado que o bacalhau provinha da água, era considerado uma comida “fria”. Esta situação levou a que os Bascos enriquecessem cada vez mais. O bacalhau tornou-se uma mercadoria lucrativa e começou a ser difícil para este povo manter em segredo a proveniência do bacalhau, que introduzia em grandes quantidades na Europa (Kurlansky, 2000).

Aventureiros de outras origens procuravam, ainda no século XII, aquelas tão apetecidas terras do norte (sendo de destacar um grupo que saiu de Lisboa em 1170 e os Irmãos Frison, embarcados em Bremen), porém não existem dados seguros que confirmem que estes tenham tentado a pesca do bacalhau.

No século XIII, provavelmente devido a alterações climáticas e de correntes marítimas, o bacalhau começou gradualmente a diminuir, primeiro no mar Cantábrico, depois na Biscaia e a seguir na Mancha. Esta crise levou a que as frotas se transferissem para o Mar do Norte, o que causou uma grande concentração de barcos neste mar e uma reacção violenta por parte dos holandeses. Decorria a guerra dos cem anos entre a França e a Inglaterra. Estes países, para evitar a abertura de uma nova frente de conflito, optaram por deslocar as suas frotas para o planalto Islandês, onde os Bascos já praticavam há muitos anos a pesca da baleia (Kurlansky, 2000).

Nos anos 80 do século XV, em pleno conflito entre os mercadores de Bristol e a Liga Hanseática, formada no século XIII e que tinha como objectivo proteger os interesses da classe mercantil das cidades do Norte da Alemanha, um funcionário alfandegário e um mercador de Bristol, propuseram-se efectuar uma viagem no sentido de descobrir uma suposta ilha onde os enigmáticos Bascos preparariam o bacalhau, que vendiam na Europa. Não há registo dos resultados dessa viagem pois estes mercadores de Bristol, tal como os Bascos, também optaram por guardar segredo (Kurlansky, 2000).

Existem documentos de autorização de exploração e de concessão de privilégios, pelo monarca português D. Manuel I a João Fernandes Lavrador e Pêro de Barcelos, datados de 1499 e 1508 respectivamente, que provam que os portugueses também exploraram a América do Norte no final do século XV e durante o século XVI (Matos, 2001).

Muitos dos primeiros mapas da Terra Nova trazem nomes portugueses, que permanecem apesar de já não serem reconhecidos como tal, como por exemplo o Cabo Raso (Cape Race) ou a Ilha do Bacalhau (Baccalieu Island).

De acordo com Hiller (1998), nomes como Terra Cortereal e Terra do Rei de Portugal aparecem nos mapas europeus, sendo claro que Portugal tinha muito interesse nos produtos provenientes nestas terras: madeira, escravos e peixe.

Apesar do tratado estabelecido em 20 de Outubro de 1353, entre o rei português D. Pedro I e Eduardo III de Inglaterra (pelo qual era permitida, por um período de 50 anos,

aos pescadores de Lisboa e Porto a pesca nas costas inglesas), ser, segundo o autor, o mais antigo texto referente a pescas portuguesas em águas do Atlântico Norte, são inúmeras as evidências de relações anteriores a esta data, com os povos escandinavos e o conhecimento oficioso sobre as viagens destes, no Atlântico Norte.



Figura 1.1 - Pormenor de Planisfério, Século. XVI, Museu Marítimo de Ílhavo

Sampaio (1923), assinala que durante a primeira metade do século XI já os Normandos mantinham relações amigáveis e de comércio com os habitantes do litoral português, de quem tinham recebido conhecimentos da navegação atlântica.

A união entre a realeza portuguesa e dinamarquesa, que remonta ao século XII, quando uma filha de D. Sancho, a princesa Berengária casou com Valdemar II, rei da Dinamarca, também concorre para fundamentar as boas relações entre estes dois reinos (Aveiro, 2009; Duarte, 1999), que se prolongou ao longo dos séculos. Assim, aquando do início da epopeia dos descobrimentos o rei dinamarquês enviou a D. Henrique, o Navegador, o piloto Sofus Larsen, com o objectivo deste participar nas explorações do Atlântico Norte, zona então frequentada pelos pescadores bascos, normandos e provavelmente portugueses, o que reforça a ideia de que em Portugal existia de facto, quem estivesse perfeitamente a par das viagens levadas a cabo pelos escandinavos (Moutinho, 1985; Duarte, 1999). Algumas interpretações dos relatos de viagem de Diogo de Teive, apontam precisamente para esta mesma ideia, ou seja, de que o destino mais certo seria a Terra Nova ou a Nova Escócia (Duarte, 1999).

Em 1472 os navegadores Portugueses João Corte Real e Álvaro Martins Homem foram integrados numa expedição Luso-Dinamarquesa, saída de Reiquejavique e após algumas

semanas chegaram a terra, que denominaram “Terra do Bacalhau” dada a abundância deste peixe naquelas águas (Aveiro, 2009). Em 1495, João Lavrador e Pêro de Barcelos chegaram à Gronelândia e à península do Lavrador, já sem a ajuda dos dinamarqueses.

Em 1497, cinco anos após Colombo ter chegado à América, John Cabot (Giovanni Cabotto), Navegador Genovês, partiu de Bristol em nome do rei Inglês Henrique VII, com o intuito de descobrir uma rota a norte para as especiarias. Chegou assim, a uma vasta costa rochosa, ideal para salgar e secar peixe, junto a um mar rico de bacalhau. Chamou-lhe Terra Nova e reclamou-a em nome da Inglaterra. Trinta e sete anos mais tarde chegou Jaques Cartier, e reclamou toda a Península de Gaspé para a França. Também ele detectou inúmeros barcos de pesca Bascos, povo que no intuito de manter o segredo da proveniência do bacalhau, nunca reclamou aquela terra para si (Kurlansky, 2000).

Sobre a descoberta atribuída a Cabot, Varela (2001) sublinha que esta viagem nunca teria sido possível se não fosse a ajuda de um importante grupo de mercadores portugueses em Bristol, os “Labrador e companhia”.

Moutinho (1985), defende que teria sido o Português Gaspar Corte Real a descobrir oficialmente a ilha da Terra Nova por volta de 1501.

A 14 de Outubro de 1506 o rei D. Manuel I cria um Alvará pelo qual manda cobrar a dízima do pescado da Terra Nova nos portos entre Douro e Minho, que serviu para pagar as despesas das viagens de Corte Real. Tal facto indica que o volume de pescas provenientes destas paragens já seria muito representativo, o que permite inferir que se tratava de uma actividade já com alguma tradição e não iniciada na altura. De facto em 1504 já haveria na Terra Nova várias colónias de pescadores de Aveiro e de Viana do Castelo, parecendo inverosímil que em tão pouco tempo (entre 1501 e 1504), se tivesse organizado uma verdadeira frota bacalhoeira e instalado estas colónias. Este alvará atesta de forma inequívoca a presença portuguesa em águas canadianas, anterior a 1500 (Moutinho, 1985; Aveiro, 2009).

Em contrapartida, em termos documentais a presença Basca na Terra Nova só se encontra formalmente provada em 1528. Relativamente à proclamação dos Bretões, Normandos e Franceses, serem os pioneiros da pesca naquela zona, onde pescariam já nos finais do século XV, a verdade é que o mais antigo documento que se conhece a este

respeito faz referência à partida de quatro navios apetrechados para a pesca do bacalhau naquelas paragens saídos de Ruão apenas em 1508 (Aveiro, 2009).

Tal como salienta Moutinho (1985), existe uma diferença entre o conhecimento económico destas regiões e o conhecimento oficial resultante de expedições efectuadas sob a responsabilidade das coroas europeias, provavelmente na busca de uma passagem para oriente, pelo Ártico, ou com o fim de recolher impostos e controlar as pescas. Esta constatação pode justificar as distintas teses, defendidas por diversos autores de diferentes nacionalidades, patentes na bibliografia relacionada com a descoberta da Terra Nova.

Independentemente da prioridade da “descoberta” da Terra Nova e dos seus bancos de pesca entre o século. XV e XVI, é inquestionável que foi Portugal um dos primeiros estados europeus a armar navios para este tipo de pesca, mas também é claro que os portugueses nunca dominaram a pescaria (Garrido, 2011).

Todavia, em 1578 o número de navios bacalhoeiros portugueses na pesca da Terra Nova, não era excedido nem por franceses, nem por ingleses, mas com a perda da independência, após o desastre de Alcácer Quibir, e a participação na armada invencível de Filipe II de Espanha, em 1588, Portugal perdeu navios e marinheiros, com repercussões negativas na pesca do bacalhau.

A guerra entre a Inglaterra e a Espanha deu aos ingleses a oportunidade de conquista fácil. Em 1583 Gilbert Raleigh conquista a Portugal a ilha da Terra Nova e dois anos depois Drake usurpa o Grande Banco e aprisiona navios portugueses carregados de peixe. Assim, durante mais de dois séculos e meio as pescas na Terra Nova foram abandonadas em favor de ingleses, holandeses e outros, numa sequência de guerras, conquistas e tratados (Salgado, 2001).

Em 1624 ainda não havia nenhum navio de Aveiro ou Viana que pescasse naquelas águas. Só as reformas pombalinas, que inclui um alvará de D. Maria I, datado de 1787, dando uma isenção de 10 anos de todos os impostos sobre pescado, excepto a sardinha, fomentaram de novo a pesca do bacalhau. O relançamento desta actividade voltou contudo, a ser contrariado com as invasões napoleónicas, que provocaram uma estagnação da actividade piscatória que durou até cerca de 1930 (Duarte, 1999).

No início do século XX, foi liberalizada a construção e armamento de navios bacalhoeiros, mas foi a partir da década de 30 que, através de legislação e incentivos financeiros estatais a armadores, se empreendeu uma verdadeira renovação da frota. Em 1932 foram instalados os primeiros motores e as primeiras câmaras frigoríficas a bordo, para permitir a manutenção do isco. Isto porque, se de início a pesca se fazia exclusivamente nos bancos da Terra Nova, foi necessário alargá-la a outras zonas de pesca devido à escassez sazonal.

No ano de 1939 surgem os primeiros navios-motor não veleiros. Esta renovação juntamente com o aumento do número de pescadores permitiu que o bacalhau pescado por portugueses tivesse chegado na década de 50, a representar em média, 70% das necessidades do país, (Gonçalves, 2001).

Durante a 2ª Guerra Mundial, apesar dos barcos apresentarem no costado o nome do barco, a bandeira portuguesa e a palavra “Portugal”, foram torpedeados 2 bacalhoeiros. Para evitar mais acidentes os barcos da frota portuguesa, foram pintados de branco, ao invés de manterem as cores características dos diferentes armadores. Por esta razão, passou a ser denominada internacionalmente pela “frota branca” (Gonçalves, 2001).

Contrariamente aos grandes produtores internacionais de bacalhau de pesca longínqua, que foram abandonando a pesca à linha, durante ou logo após a 2ª Guerra Mundial, Portugal manteve-a até 1974. Uma das razões que justificou esta opção prende-se com o menor investimento envolvido na construção dos navios de madeira (lugres com motor ou grandes navios-motor), adequados a este tipo de pesca, quando comparado com os arrastões. A tecnologia obsoleta, que caracteriza desta forma a pesca portuguesa do bacalhau, acaba por se traduzir em baixos índices de produtividade por unidade de pesca (Garrido, 2001).

A revolução de Abril de 1974 veio contribuir para o fim da pesca com artes de anzol. Terminam as condições do Estado que permitiam garantir o recrutamento de pescadores para o ofício da pesca à linha, crédito abundante e barato para os armadores, reserva de mercado e preços mínimos de venda do bacalhau aos armazenistas (Garrido, 2001).

No contexto sociopolítico pós revolução, a delegação portuguesa que participou na IIIª Conferência da Nações Unidas sobre Direito do Mar, aderiu ao conceito de “zona económica exclusiva”, incompatível com os interesses da pesca longínqua. Esta posição, aliada ao movimento descolonizador, marcou o início do fim das grandes frotas de pesca

distante, quer do bacalhau, quer da pescada e de outras espécies que os portugueses pescavam ao longo da costa ocidental de África (Garrido, 2001).

A ligação de Portugal ao mar, à descoberta de rotas marítimas, à pesca, faz com que a sua história esteja forçosamente entretida na história da pesca do bacalhau. O século XX está repleto de testemunhos na primeira pessoa, de homens que participaram directamente nesta vida de pesca à linha. Homens que em pequenos barcos de madeira, “dóris”, se lançavam na solidão do imenso mar, tendo como único vínculo ao barco principal um búzio. A maioria desconhecendo que o peixe, que capturava durante difíceis campanhas de 6 meses, longe da sua casa e dos seus, já havia sido fundamental na dieta alimentar dos povos da Europa medieval, permitido sustento durante as longas viagens de exploração e colonização, desencadeado guerras e originado revoltas.

As bibliotecas ligadas ao sector estão repletas de documentos, livros e revistas com relatos de viagens, descrições da construção de navios, estudos sobre o processamento e a comercialização do bacalhau. Estes estudos correspondem sobretudo às décadas entre 30 e 60 do século XX, que coincide com o período áureo da “Campanha do Bacalhau”.

As frotas de arrastões vieram destronar a frota de barcos de pesca à linha. Em Portugal, a defesa da pesca à linha, os enormes sacrifícios pessoais que representava e a baixa produtividade inerente, terá sido assim, um dos principais motes para a diminuição, ou o fim da pesca longínqua.

Mas a história da pesca do bacalhau está longe de estar finalizada. Nos dias de hoje, outra realidade se impõe. A necessidade de defender a sustentabilidade e apostar na biodiversidade.

Paradoxalmente, a aposta outrora feita, nos arrastões e pesca intensiva, responsável pela decadência da frota portuguesa da pesca à linha, revela-se a principal razão pela escassez de peixe, que ameaça o sector bacalhoeiro. Os danos que causam no fundo dos mares, destruindo os habitats marinhos, incluindo as zonas de desova do bacalhau, e a enorme capacidade de capturar grandes quantidades de peixe, em pouco tempo, representam um inimigo da pesca sustentável.

Devido à escassez de bacalhau, em 1992 a pesca deste peixe foi encerrada pelo governo canadiano na Terra Nova e no Labrador. Como consequência mais de 40000 pessoas

perderam o emprego. Passadas duas décadas ainda não há sinais de recuperação, pelo menos o suficiente para sustentar as economias locais. Também as autoridades norueguesas foram forçadas a restringir a pesca na zona do último dos grandes “stocks” de bacalhau do Atlântico, o chamado bacalhau do Nordeste Ártico, devido a situações de declínio alarmantes (Greenpeace, 2010).

Esta situação é extremamente grave, pois apesar do excesso de captura de uma única espécie ser geralmente reversível, segundo estudos efectuados a recuperação após declínios prolongados, como os que decorreram no mar da Terra Nova, em relação ao bacalhau, pode levar mais de 15 anos (Hutchings, 2000).

As técnicas de pesca à linha, que tornaram a nossa frota pouco competitiva, podem fazer parte da solução para problemas actuais, desde que acompanhadas com a aplicação de novos conhecimentos e estudos, que visem melhorar as condições de vida dos pescadores, a segurança dos barcos, a qualidade do pescado e o controlo da exploração dos recursos marítimos.

1.2. Importância Económica do Bacalhau

Nos inícios do século XVI, a economia da Europa estava bem posicionada para as novas importações de bacalhau, devido ao aumento da população e expansão económica - graças à prosperidade na agricultura e à pequena indústria - que permitia obter o financiamento para expedições a distantes zonas de pesca.

Entre 1450 e 1650 a população duplicou e a necessidade de alimentar as populações europeias levou a um aumento da importação de peixe e carne (Varela, 2001).

No Atlântico Norte, até então, os bancos de pesca de elevados recursos, eram explorados sobretudo por pequenos armadores oriundos da Noruega, Islândia, Dinamarca, Bretanha, Inglaterra, Portugal e País Basco, que indiferentes às políticas nacionais pescavam juntos o bacalhau, a baleia e o arenque, repartindo entre si as tarefas sem conflito, ao mesmo tempo que asseguravam a venda do produto. Contudo, esta realidade foi alterada quando em 1478 as autoridades dinamarquesas vedaram aos estrangeiros o acesso aos bancos pesqueiros da Islândia, por eles controlados. Tal facto, levou a uma acentuada crise, resultando na falência de pequenos armadores e falta de recursos na Europa. Por exemplo, a cidade de Paris correu o risco de perder a sua

iluminação, que era efectuada com lamparinas alimentadas a óleo de baleia, precisamente devido à escassez deste produto. Foram estas circunstâncias que acabaram por empurrar os pescadores para outros territórios no Atlântico Norte não controlados pelos dinamarqueses (Varela, 2001).

As reservas abundantes de bacalhau na Terra Nova e Costa do Labrador chamaram a atenção de diversas nações europeias. O facto de o bacalhau ser uma boa fonte alimentar, facilmente preservável e transportável, e do comércio dos produtos de pesca já estar bem implementado na economia europeia, tornou fácil a venda do bacalhau proveniente da Terra Nova, utilizando a rede de distribuição já existente (Varela, 2001).

De acordo com informações patentes em Garrido (2011), nos séculos XVI e XVII o Estado Português tinha grande interesse no comércio do bacalhau, sendo que a Coroa estabeleceu direitos alfandegários e procurou regulamentar o negócio.

Nas primeiras décadas do século XVI, reuniram-se esforços e capital no sentido de organizar frotas em Aveiro, Viana do Castelo e Porto, destinadas à pesca do bacalhau, embora de início, a coroa não tivesse grande interesse em manter uma rota permanente com a mítica Terra Nova. Tal opção representaria um elevado custo e risco. Apesar disso, por volta de 1520 partiram colonos dos Açores, Viana e Aveiro, para povoar estas paragens. Depois de um fracasso inicial, esta intenção foi repetida, como prova a doação e confirmação régia da capitania da “Terra Nova dos Bacalhaus”, justificando-se esta situação favorável pelo facto de boa parte do bacalhau desembarcado por navios portugueses ter por destino a exportação (Garrido, 2011).

Os portugueses foram os únicos a ter colónias fixas na Terra Nova e na costa do Canadá. Só de Aveiro saíam anualmente cerca de 60 navios rumo à Terra Nova, no início do século XVI, número que duplicou em cinquenta anos. As colónias dos portugueses distinguiam-se perfeitamente das bases temporárias de bretões, normandos e ingleses, que eram constituídas por meras barracas e toldos nas praias (Varela, 2001).

Inicialmente o bacalhau servia de moeda de troca nas importações de ferro, madeiras e outros produtos, mas tal situação foi efémera, pois rapidamente a necessidade de importar o bacalhau, para satisfazer as necessidades de consumo, sobrepôs-se à exportação.

A suspensão da pesca por navios portugueses acabou por ocorrer, prolongando-se até à primeira metade do século XIX, devido à perda da independência, à pirataria, ao assoreamento das barras de Aveiro e Viana e ao aumento do domínio britânico dos mares (Garrido, 2011).

Apesar de Cabot ter reclamado a América do Norte para a Inglaterra, só depois do conflito travado entre os Ingleses e os alemães da Liga Hanseática, por causa dos direitos sobre o bacalhau islandês, é que os ingleses entraram na “corrida ao bacalhau” da Terra Nova. Começaram a desenvolver-se portos de pesca na costa ocidental da Grã-Bretanha que, até à primeira metade do século XX, se mantiveram os portos mais importantes para a pesca na Terra Nova, assim como os de St. Malo, Vigo e os portos portugueses (Kurlansky, 2000).

Os franceses e ingleses foram ocupando e povoando, aos poucos, os territórios da Terra Nova e, em 1604 (aquando da dinastia filipina), já os franceses impediam o comércio da pesca peninsular, controlando as pescas do bacalhau.

Uma das principais razões que permitiu esta situação foi o investimento nas “carreiras das Índias” portuguesas e espanholas que deixaram sem protecção a frota pesqueira.

É o tratado de Utrecht, de 1713, que oficialmente termina as rotas portuguesas da pesca do bacalhau. Neste tratado a França cedia à Inglaterra a Terra Nova e ilhas adjacentes e ficava com direito de pesca desde o cabo da Boa Vista até a Ponta Rica e ao Cabo Bretão (Varela, 2001).

Ainda segundo Varela (2001), nos finais do século XVIII o comércio de bacalhau era partilhado por franceses e ingleses e movimentava 45000 homens em 1500 navios, capturando anualmente uma média de 90000 toneladas de bacalhau.

Nesta conjuntura comercial os britânicos tinham pouco sal, que representava uma enorme desvantagem em relação aos franceses, espanhóis e portugueses. Esta limitação em alguns momentos, foi suprida recorrendo ao sal português em troca de protecção face aos ataques franceses. Todavia, a união das duas coroas ibéricas terminou com esta colaboração, uma vez que Inglaterra se encontrava em guerra com Espanha (Canas, 2001).

Os países do Norte, com falta de sal, optavam por preparar peixe apenas no Inverno, que secavam sem salgar. Como os Ingleses queriam produzir bacalhau todo o ano, para fazer

face à procura do mercado, mas confrontavam-se com temperaturas de Verão demasiado altas (mesmo na Islândia), para permitirem um boa e segura secagem, ficaram dependentes do sal, sendo que, alguns peixes eram vendidos apenas salgados, sem secagem (bacalhau salgado verde). E foi por este motivo que inventaram um produto que se tornaria preferido nos mercados do Mediterrâneo e nas Caraíbas durante séculos: um bacalhau seco ligeiramente salgado. Os britânicos experimentaram fazer a cura do bacalhau seco no Verão, no entanto a cura de Inverno era considerada muito melhor (Kurlansky, 2000).

O Mediterrâneo foi sempre o mercado mais exigente em relação ao bacalhau desde a Idade Média até ao século XX. Os Norte-Americanos não tiveram muito sucesso neste mercado. A Terra Nova e a Nova Escócia eram muito dependentes da pesca e produtos da pesca, mas a qualidade do produto era fraca e vendiam sobretudo para as Caraíbas e em Boston. A única excepção era o Bacalhau Gaspé, cuja cura, sendo de boa qualidade era vendido para o mercado mediterrânico, o mais exigente, onde era muito apreciado representando assim, uma boa fonte de receita (Kurlansky, 2000). Este produto era conseguido graças às condições geográficas e climáticas do local onde era processado, caracterizadas por ventos de noroeste, temperatura inferior 24 °C e humidade relativa inferior a 80%, condições que não se encontravam reunidas noutras paragens.

A indústria da pesca do bacalhau em Portugal renasceu em 1829, devido à inclusão desta actividade nos trabalhos da Companhia de Pescarias Lisbonense. O relatório de Jacob Pereira de Azambuja, cônsul de Portugal nos Estados Unidos da América, que demonstrava os elevados lucros obtidos por esse país e pela Inglaterra, e a abolição temporária do imposto sobre o pescado da pesca longínqua em 1830, que se prolongou até 1842, contribuíram decisivamente para este renascimento. Todavia, apesar da Companhia de Pescarias Lisbonense ter fundado secas no Faial e na Trafaria e de, em 1848, ter enviado para a pesca do Bacalhau 19 navios, acabou por falir em 1857 (Rodrigues, 2001; Dias *et al*, 2001; Gonçalves, 2001).

Surgem duas novas companhias de armadores açorianos em 1866, Bensaúde & C.^a e Mariano & Irmãos, que mantêm o exclusivo da pesca do bacalhau até 1903, altura em que se liberalizou a construção e armamento de navios bacalhoeiros, dando um novo impulso a esta indústria. O século XIX foi de resto, profuso em medidas político-

económicas, algumas benéficas, outras causadoras de estrangulamentos ao nível do desenvolvimento da frota nacional favorecendo monopólios em proveito de apenas alguns armadores (Rodrigues, 2001).

No final da monarquia eram consumidas 28 000 toneladas de bacalhau por ano, quantidade que estava muito para além das 2400 toneladas capturadas pelos navios portugueses.

Após a primeira Grande Guerra até 1924, o número dos navios bacalhoeiros portugueses aumenta extraordinariamente. Contudo, até ao fim dos anos 30, do século passado, a captura nacional contribuiu em pouco mais de 10% para o consumo nacional de bacalhau (Rodrigues, 2001; Duarte, 2000).

No ano de 1934 foi criada a Comissão Reguladora do Comércio de Bacalhau (CRCB), com vista a garantir ao produto, pescado em navios nacionais, uma defesa suficiente contra a concorrência excessiva do produto estrangeiro (Duarte, 2000).

No intervalo de tempo que decorreu entre 1936 e 1967 o Estado Novo procurou a reorganização corporativa da indústria, no que se designou “campanha do Bacalhau”. Neste período duplicou o total de navios, que seguiam para a pesca do bacalhau e o estado procurou estimular o aumento da oferta, controlar o crescimento das importações e dos preços, evitando a sua subida (Garrido, 2001).

Apesar deste impulso à frota bacalhoeira, a primazia residia nos barcos de pesca à linha, o que se traduzia em índices de produtividade muito aquém dos de outros países que, como já foi referido, começaram a abandonar este tipo de pesca, durante e logo após a 2ª Guerra mundial, substituindo-a pelo arrasto. De 1934 a 1967, embora a capacidade de pesca da frota do bacalhau tenha sido multiplicada por seis, a produtividade por navio apenas triplicou. Ou seja, o aumento da produção nacional de bacalhau só se tornou possível por acréscimo da capacidade de produção e não pelo aumento significativo nos índices de produtividade e da técnica (Garrido, 2001).

Neste período o número de pescadores aumentou significativamente, fruto de uma política que garantia o seu recrutamento, apesar das condições de trabalho serem extremamente difíceis. Do final deste período até 1982 verificou-se uma queda acentuada da pesca devido à escassez do pescado e à procura do alargamento da jurisdição dos países costeiros. De facto, a pesca longínqua sofreu um enorme revés quando em 1974, na III Conferência das Nações Unidas sobre o Direito do Mar, vários

estados, incluindo Portugal, defenderam o conceito de “zona económica exclusiva” (Garrido, 2001).

Com a entrada de Portugal em 1986 na CEE, é extinta a CRCB. Em consonância com a Política comum de Pescas (PCP), foram transpostos para o quadro comunitário os acordos bilaterais, em que Portugal fazia valer os seus direitos históricos e o seu relevante mercado de consumo. Isto explica a diminuição das quotas e a redução das capturas e da frota que, juntamente com a progressiva substituição da salga a bordo pela congelação, tornou pouco justificável a existência de uma frota especializada de bacalhoeiros. Após 1992 o comportamento é determinado pelo agravamento da situação dos recursos e pela reorientação geográfica da actividade (Dias *et al*, 2001), resultado da escassez do bacalhau em determinadas zonas, particularmente na Terra Nova e no Labrador, onde, como já foi referido, o governo canadiano se viu forçado a encerrar a pesca.

Segundo a Greenpeace (2010), dos 16 “stocks” comerciais de bacalhau do Atlântico, apenas os da Islândia, Mar de Barents (norte da Noruega) e do Báltico são considerados sustentáveis pelos cientistas. O maior “stock” de bacalhau do Atlântico reside no Mar de Barents, a Norte da Noruega e da Rússia. Apesar deste ser considerado saudável e bem-gerido, se a exploração intensiva continuar poderá entrar em declínio, pelo que é imprescindível o estabelecimento de quotas com base nas recomendações do ICES (Conselho Internacional para a Exploração do Mar) e fiscalização da zona, que neste caso está a cargo da Noruega.

Recentemente, no que respeita ao estado de reservas e possibilidades de pesca em termos de águas internacionais, de acordo com informações do INE (2011), registou-se um aumento das quotas de bacalhau na Noruega e Svalbard. Através da troca de quotas foi possível obter mais 6856 toneladas, isto é mais 32% das quotas iniciais, e registou-se uma utilização de 89,8% dessas possibilidades de pesca. Por outro lado foi levantada uma moratória existente desde 1998 na Organização de Pescas do Atlântico Noroeste (NAFO), que permitiu que em 2009 a pesca tenha sido retomada em Flemish Cap, ao largo da zona económica exclusiva do Canadá. Na zona, o total admissível de capturas (TAC), ficou estabelecido em 5500 toneladas, o que resultou numa quota de 1070 toneladas para Portugal.

Importa acrescentar que, segundo as últimas negociações efectuadas em contexto europeu está previsto para 2013 um aumento da quota de Portugal

Segundo os dados mais recentemente divulgados da Balança Alimentar do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2010), entre 2003 e 2008, os portugueses consumiram, em média, menos 20% de bacalhau, em particular a partir de 2006. Como explicação para esta tendência é apontado o aumento do preço que, para os produtos secos e salgados, foi de 6,2% em 2007 e 9,4% em 2008, face a preços de 2002.

Ainda de acordo com dados patentes nas estatísticas da pesca (INE, 2011), respeitantes a 2009, sobre a produção de “secos e salgados” (53000 toneladas), foi registada uma subida de 10,7%, para a qual contribuiu a produção de “bacalhau salgado seco” (+22,5%). Em relação à “produção” de bacalhau congelado houve um aumento significativo, devido ao aumento de exportações deste tipo de produto, como consequência da conquista de um novo mercado externo no Brasil, graças à apetência dos consumidores para novas formas de comercialização e apresentação.

Em 2009 foram vendidas pela indústria transformadora 34287 toneladas de bacalhau salgado seco, representando um total de 195 789 000 euros.

O Brasil absorve cerca de 45% das exportações de bacalhau, correspondente a 7 mil toneladas de bacalhau salgado e 60 milhões de euros. França e Angola, com uma fatia de 15% cada, são os outros destinos de relevo.

Os principais fornecedores de bacalhau salgado verde, que é a base de sustentação da indústria de secagem, são a Noruega, Islândia, EUA (Alaska) e Rússia (Duarte, 2000). Portugal absorve cerca de 48 % das exportações deste produto da Islândia, (Thórarinsdóttir, 2010).

Em relação ao bacalhau congelado, matéria-prima necessária para a indústria que o transforma em salgado, secando-o depois, os principais fornecedores são a Rússia, EUA, Grã-Bretanha e Espanha (Duarte, 2000).

No mercado nacional os preços de venda ao consumidor, praticados no comércio tradicional especializado neste tipo de iguaria, são em média mais elevados do que nas grandes superfícies. Nas lojas da Rua do Arsenal e Praça da Figueira em Lisboa, em Fevereiro de 2012, os preços variavam entre 5-6 euros/kg para o bacalhau crescido, 13-15 euros/kg para o graúdo e 18-20 euros/kg no caso do especial. Nos hipermercados os preços variam entre 5 e 16 euros/kg (<http://www.agenciafinanceira.iol.pt>).

No topo dos preços surge o bacalhau de cura amarela apresentando valores que rondam os 30 euros/kg. No mês em que se fez a consulta não havia disponibilidade deste tipo de produto. É na época natalícia que há maior procura, o que justifica maiores encomendas por parte dos retalhistas, levando a indústria a produzir este bacalhau essencialmente nesta altura do ano. Segundo os vendedores das casas da especialidade, nessa época vende-se todo “*por ter mais óleo, a cor amarela, um sabor especial, um cheiro mais intenso mais ao gosto das pessoas antigas*”.

A mais-valia deste produto é partilhada também por algumas grandes superfícies, onde se encontram preços de 14 a 20 euros/kg de bacalhau de cura amarela, consoante a origem e a categoria, ou seja, valores superiores aos já referidos, para o bacalhau salgado seco comercializado nestes mesmos locais ([continenteonline](#); [catálogos.elcorteingles.pt](#)).

1.3. Biologia, distribuição e composição Nutricional do Bacalhau

O bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), é uma das 59 espécies da família Gadidae, sendo a família mais representativa e numerosa na área Canadiana (Lear, 1984).

É um peixe redondo, com corpo alongado, com a metade posterior fusiforme e recoberto de escamas pequenas, excepto na cabeça, como a pescada, a faneca e o badejo (Figura 1.2). Apresenta uma cabeça grande, de lábios carnudos e largamente fendida. O maxilar superior é mais saliente que o inferior (Castro, 1946).

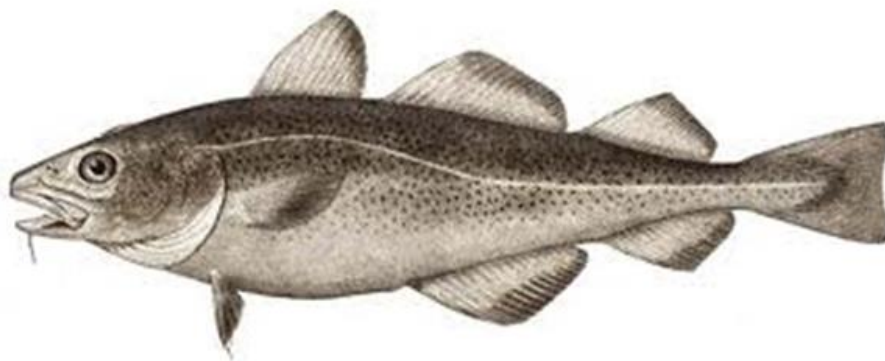


Figura 1.2 - Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*)
(Fonte: <http://www.scientificlib.com/en/Biology/Animalia/Chordata/Vertebrata/GadusMorhua01.html>).

A cor da pele varia consoante as regiões que habita apresentando-se vulgarmente com uma tonalidade cinzenta, verde azeitona claro ou acastanhada, exibindo com frequência manchas negras arredondadas. A barbatana dorsal é formada por três lobos distintos e separados e a anal por dois situados por baixo da segunda e terceira dorsais. As barbatanas pélvicas são curtas (Lear, 1984; Botelho 1958a).

Os olhos são grandes e cobertos por uma membrana transparente. Os dentes implantam-se nos dois maxilares e no vómer, em várias camadas; não existem, porém, nos ossos palatinos. Os opérculos são angulosos e os seus bordos livres unidos (Castro, 1946; Botelho, 1958a).

O bacalhau é um peixe predominantemente de águas frias com temperatura inferior a 10 °C, podendo suportar uma gama de temperaturas entre de 0 °C e 20 °C.

Distribui-se geograficamente nos dois lados do Atlântico Norte. Estende-se para sul até ao Golfo da Biscaia, chega a Nordeste, e vai até ao Cabo Hateras, a Noroeste como ilustra a Figura 1.3. (Lear, 1984).

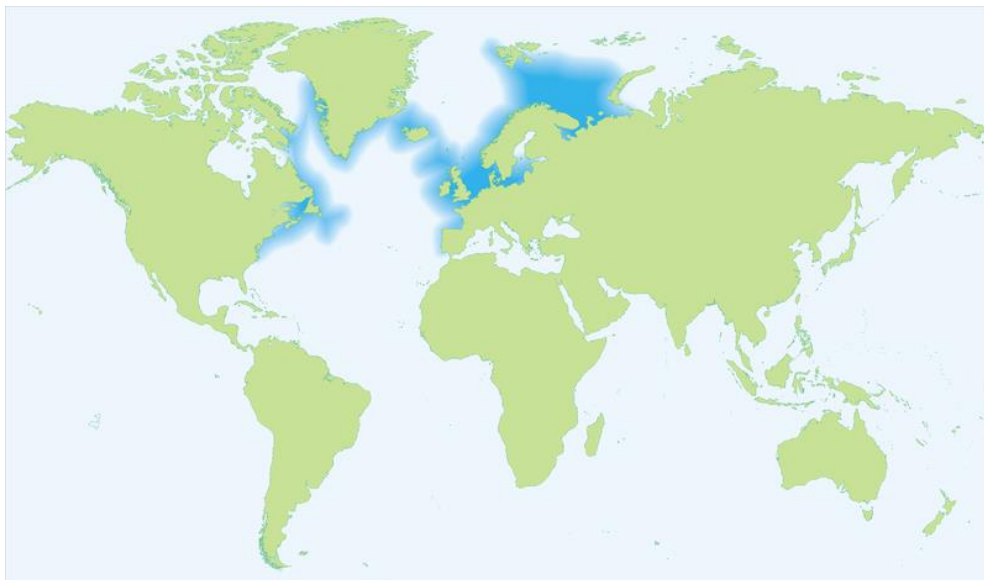


Figura 1.3 - Distribuição do bacalhau no Atlântico Norte (Fonte: wikipedia.org/wiki/File:Gadus_morhua-Atlantic_cod.png).

É nas águas da Costa da Gronelândia, na América do norte e na Terra Nova, que existem as maiores concentrações. Na costa Europeia abunda na Islândia, Ilhas Faroe, costas da Noruega, Mar de Barents, Mar Branco, Mar Báltico e Mar do Norte. Pode ser encontrado a uma profundidade de cinco a seiscentos metros, sendo que o bacalhau adulto vive

sobretudo em águas profundas, podendo no entanto viver mais perto da superfície em virtude de condições hidrográficas desfavoráveis, ou quando se alimenta, ou efectua a postura (Botelho, 1958a).

As concentrações mais importantes correspondem a populações migratórias, que efectuem longas deslocações dentro da sua área de distribuição, percorrendo por vezes milhares de quilómetros. As migrações devem-se à busca de alimentos e reprodução, sendo as rotas condicionadas por factores hidrográficos tais como temperatura da água, as correntes, a profundidade, salinidade e o relevo submarino. Estas condições determinam também a distribuição dos ovos e das larvas deste peixe.

Os ovos podem desenvolver-se desde temperatura inferior a 0 °C até cerca dos 14 °C, mas a temperatura óptima para o seu desenvolvimento situa-se entre os 4 °C e os 7 °C, sendo que a mortalidade é muito elevada (Botelho, 1958a; Lear, 1984).

O bacalhau é normalmente heterossexual, desovando apenas uma vez por ano, associando-se durante o período de reprodução em cardumes muito densos, que permite assegurar a fertilização de um elevado número de ovos (Lear, 1984). A reprodução inicia-se em regra aos 4 anos de idade (Botelho, 1958a).

A fecundação é externa, muito facilitada pela proximidade do macho e da fêmea enquanto nadam. O número de ovos lançados na água varia, dependendo do tamanho das fêmeas, entre 500 mil e 7 milhões (por vezes mais). Após a fecundação, os ovos transparentes e pelágicos, sobem rapidamente até à superfície do mar (devido à presença de uma gota de óleo no seu interior), onde iniciam o seu desenvolvimento embrionário, que dura duas a quatro semanas consoante a temperatura.

Apesar de esta espécie ser muito prolífera, a taxa de mortalidade é muito elevada. Dos vários milhões de ovos de cada fêmea, apenas um ovo em cada milhão completa o ciclo tornando-se um bacalhau adulto (Botelho, 1958a; Lear, 1984).

As larvas ao nascerem medem cerca de 5 mm e continuam a viver à superfície alimentando-se do plâncton e após três a cinco meses os juvenis já medem 3 a 6 cm e descem para o fundo onde se alimentam de invertebrados. Muitas vezes os ovos e larvas são arrastados por correntes para longe dos locais de origem.

A principal época da desova ocorre entre os meses de Novembro e Junho, em profundidades entre os 60 e os 80 metros e a uma temperatura entre 0 °C e os 12 °C, com variações próprias de região, para região. Por exemplo no Cabo Cod a postura faz-

se de Novembro a Dezembro e, no Golfo de Maine, de Dezembro a Abril (Botelho, 1958a; Manso e Cruz, 1984).

Este peixe é omnívoro e muito voraz. Na idade juvenil alimenta-se sobretudo de invertebrados mas na idade adulta qualquer presa lhe serve como alimento, com preferência pelo arenque, capelím e lulas (Lear, 1984; Manso e Cruz, 1984).

Durante o período de desova praticamente não se alimenta, pelo que depois desta fase inicia uma recuperação acompanhada de alimentação intensa, migrando para locais onde a alimentação é mais abundante.

Quanto maior a densidade populacional, maior a competição pelo alimento, menor a quantidade de alimento disponível e conseqüentemente mais lento o crescimento. Por esta razão a taxa de crescimento dos juvenis depende da temperatura e da densidade populacional do “banco”.

O bacalhau pode atingir com frequência 16 a 20 anos de idade (Manso e Cruz, 1984), e em média atinge um peso de 2 a 3 kg e 60-70 cm de comprimento. Geralmente não excedem 30 kg, mas há um recorde de um peixe com cerca de 96 kg e mais de 180 cm (Lear, 1984).

Quando desova migra para os locais preferidos, ocasionando uma grande concentração de peixe e tornando a captura muito fácil com redes de arrasto. Após a desova, quando se dirige para locais com maior disponibilidade de alimento, torna-se mais susceptível à pesca com redes de emalhar e linha (Manso e Cruz, 1984).

A composição média do peixe eviscerado é de cerca de 73% de parte edível, 21% de osso e 6% de pele (Lauritzsen, 2004).

Enquanto produto alimentar, o bacalhau apresenta uma composição nutricional que varia consoante o tipo de cura (com uma salga mais leve ou mais forte), o estado (seco ou demolido), já para não falar do tamanho do peixe, época, idade e local de pesca aquando da captura.

Num estudo de caracterização nutricional do bacalhau desenvolvido por Gonçalves Ferreira (1951), são indicados valores de proteína de 34,4% (bacalhau «Nacional»), 42% (bacalhau «Noruega»), 50,6% (bacalhau «Terra Nova»), e de gordura 0,65%, 0,5% e 0,8% respectivamente. O teor de humidade foi de 44% («Nacional»), 32,7% («Noruega») e 35,7% («Terra Nova»). Em relação aos aminoácidos os mais representativos foram arginina, leucina, lisina e valina.

Gonçalves Ferreira (1953) aprofundou mais tarde o estudo anteriormente publicado, sendo que, desta feita comparou, para além dos anteriormente analisados, mais tipos de bacalhau nomeadamente «Escócia», «Francês» e «Islândia». O valor médio mais baixo de cloretos foi determinado no «Terra Nova» (14,4%) e o mais alto no «Escócia»; Em relação à Humidade o valor mais elevado foi apresentado pelo «Escócia» (44,4%) e o menor pelo «Terra Nova» (40%).

No que concerne à proteína, o mesmo autor determinou o valor médio mais alto (53%) no bacalhau «Terra Nova» e o mais baixo no «Escócia» (33,25%).

Botelho (1958b) em relação ao bacalhau (*Gadus morhua*) fresco “Nacional”, aponta valores de 80,4% de humidade e de 17,9% de proteína, semelhantes aos indicados por outros autores (Murray e Burt, 1969; Huss, 1995; INSA,2006).

A qualidade da proteína é elevada. Contém, nas proporções adequadas, os tipos de aminoácidos requeridos para a manutenção e desenvolvimento dos tecidos humanos, (Nettleton, 1985 *cit in* Lauritzsen, 2004). Do teor de azoto total presente no músculo, aproximadamente 95% é proteína e 5% é constituído por compostos azotados não proteicos, nomeadamente péptidos e aminoácidos (Lauritzsen, 2004).

Relativamente ao teor de lípidos, o músculo branco dos peixes magros, como o bacalhau, contém menos de 1%, maioritariamente fosfolípidos, localizados nas membranas (Huss, 1995;Lauritzsen, 2004; INSA 2006).

No estudo desenvolvido por Gonçalves Ferreira (1953), o tipo de bacalhau que apresentou maior percentagem de gordura foi o «Terra Nova» (0,65%), enquanto Botelho (1958b) indica valores entre 0,25 e 0,35% e Murray e Burt (1969), determinaram 0,1 a 0,9% de lípidos.

O bacalhau entra na categoria dos peixes magros precisamente porque, ao contrário dos peixes gordos que armazenam os lípidos nas células gordas ao longo de todo o corpo, estes armazenam-os no fígado, sendo utilizados como fonte de energia para fazer face aos períodos de migração e reprodução (Huss, 1995).

Nos peixes magros, como o bacalhau, o colesterol muscular pode ser encontrado numa quantidade de 6% do total de lípidos (Huss, 1995). O bacalhau fresco apresenta valores de colesterol inferiores a 50 mg/100g (Favier *et al.*, 1995; INSA, 2006; Gonçalves, 2011).

Apesar do conteúdo em gordura ser baixo, a gordura é rica em ácidos gordos polinsaturados particularmente ómega-3, como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω 3) o que contribui para prevenir algumas doenças cardiovasculares (Nettleton, 1985 *cit in* Lauritzsen, 2004; Batista *et al.*, 2008).

O INSA (2006) indica para o bacalhau fresco um teor de cinza de 1,4% da parte edível. A mesma fonte aponta valores de Na, K; Ca e Mg de 65, 362, 15 e 26 mg/100g respectivamente.

A influência da salga e da cura reflecte-se de tal forma na composição físico-química, que esta serve de base à caracterização dos diferentes produtos.

Relativamente à caracterização química do bacalhau salgado verde, que representa a matéria-prima para os processos de secagem e cura posteriores, a AIB (2010), estabelece como valores de humidade < 56%, de cloretos > 18% e de proteína > 18%.

No aviso nº 15 094/2007 do DR 2ª série, nº 159 – 20 Agosto de 2007, encontram-se discriminadas as características químicas do bacalhau de cura tradicional portuguesa (bacalhau salgado seco), sendo o valor indicado para a Proteína \geq 26 g/ 100g e para a humidade \leq 47%.

O *bacalhau salgado seco de cura amarela*, segundo a definição patente no artigo 3º do Decreto Lei nº25/2005, de 28 de Janeiro, é um “produto sangrado, eviscerado, descabeçado, escalado e lavado, que, após maturação físico-química pelo sal, apresenta teor igual ou superior a 12% e inferior a 16% de NaCl, com um teor de humidade igual ou inferior a 45% após lavagem e posterior secagem, por evaporação natural ou artificial, e uma coloração amarela característica”.

Relativamente ao bacalhau Gaspé (ou de cura amarela), uma empresa desta região canadiana (www.gaspeured.com), apresenta no seu «sítio da Web» uma tabela com os seguintes dados por 100g de produto: Proteína 40 g, Gordura 0,1 g, Colesterol 155 mg, Potássio 710 mg, Cálcio 90 mg. Indica ainda, uma percentagem de humidade de 42 ou 48%.

1.4. Aspectos tecnológicos de processamento do bacalhau

1.4.1. Captura, sangria, descabeçamento, evisceração e escala

A evolução tecnológica a bordo dos barcos pesqueiros, aliada ao maior conhecimento dos movimentos migratórios do bacalhau, dos fundos marinhos, sua natureza e

profundidade, a possibilidade de avaliar e monitorizar as temperaturas e salinidades das águas, levou a que os métodos de pesca se fossem modificando ao longo dos tempos. Por outro lado, também o estudo da biologia deste peixe contribuiu para melhorar as formas de captura.

Os métodos mais antigos empregues na pesca eram a “azagaia” que consistia num aparelho de formato de peixe com dois ganchos e os anzóis. Estes tinham que empregar “iscos” e podiam ser iscados em linhas de mão (Castro, 1946; Garrido, 2011).

Só quando os barcos começaram a ter câmaras frigoríficas a bordo é que se tornou possível congelar o isco e usar o “trol”, que consistia numa sucessão de linhas de pesca com anzóis, sistema muito vantajoso por exigir menor esforço e permitir capturar mais peixe em menos tempo. Este sistema começou a ser utilizado pelos franceses a partir do princípio do século XX, mas em Portugal, só em 1937 (Marques, 2001).

Posteriormente a utilização das redes fixas, de cerco, ou de arrasto evita o recurso a iscos e o trabalho é feito a partir do barco principal, não havendo necessidade de recorrer a pequenas embarcações denominadas “doris” (Castro, 1946). Porém, não é compatível com os navios à vela, porque estes não garantem uma velocidade de tracção regular, necessária ao arrastão.

Todos os autores são unânimes em reconhecer que a forma de captura e subsequente tratamento a bordo são determinantes para a qualidade do peixe (Botelho, 1953b; Soudan, 1955; Shewan, 1962; Esaiassen, *et al.*, 2004).

Na pesca à linha existe a vantagem do peixe poder ser logo sangrado. Este procedimento contraria o desenvolvimento microbiano. Os peixes sangrados entram mais rapidamente em rigidez cadavérica, do que aqueles que são mortos por asfixia, pois têm uma morte mais rápida, com contracções musculares que levam à produção de ácido láctico baixando o pH (Botelho, 1953b; Castro, 1946).

Além deste passo ser importante para a preservação do peixe, influencia também o aspecto do bacalhau, que se torna escuro quando mal sangrado (Botelho, 1953b). Os peixes mal sangrados são os que apresentam um aumento do amarelecimento, devido à difusão do sangue que permanece pelos tecidos e que subsiste mesmo depois de uma lavagem rápida. (Soudan, 1955).

Após a sangria, que visa remover a maior quantidade de sangue possível, ocorre o descabeçamento, a evisceração e a escala.

A evisceração deve ser feita rapidamente e de forma segura, para não deixar restos de vísceras que serão veículo de contaminação microbiana. Aproveitam-se os fígados, para extracção do óleo e as bexigas-natatórias, que são conservadas em sal, podendo ser utilizadas para o fabrico de cola, juntamente com a pele do bacalhau, ou na produção de samos (Botelho, 1953b).

O bacalhau pode ser armazenado em frio (0-1 °C), ou imediatamente congelado com cabeça, ou já descabeçado, mas sempre sem vísceras. A qualidade do produto congelado dependerá da qualidade da matéria-prima. Um bacalhau inteiro que seja congelado até 3 dias após a captura, posteriormente pode ser manipulado como se tratasse de pescado fresco (Horne, 2001).

A escala do peixe é uma fase obrigatória anterior à salga, pois vai permitir aumentar a superfície de lavagem e de contacto com o sal (Botelho, 1953b).

1.4.2. Lavagem, salga e maturação

LAVAGEM

A preparação e lavagem preliminares do peixe são de considerável importância, sobretudo se a temperatura é elevada.

A lavagem visa a remoção de restos de vísceras, sangue e do muco existente nas dobras das barbatanas, para que o músculo fique perfeitamente limpo e branco. Neste processo o peixe é colocado sobre plataformas, onde a água corre em abundância, e recorre-se a luvas de estopa e escovas (Rodrigues, 2006).

Os fenómenos de autólise não se iniciam nas 4 horas que se seguem à morte do peixe pelo que a salga, iniciada neste intervalo de tempo, assegura um bom produto. Quando não é possível processar o peixe a bordo, congelar é a melhor forma de prevenir a deterioração mencionada (Moutinho, 1985). Um limite de 3-4 horas entre a pesca e a salga é aconselhado por Jarvis (1950). Caso não seja possível, o bacalhau deverá ser sangrado, pois o sangue é uma fonte rica de enzimas, lavado e colocado no gelo.

SALGA

A etapa da salga feita a bordo dos barcos de pesca era essencial para a conservação do peixe ao longo da viagem de regresso, sobretudo numa época em que os barcos não

tinham meios de refrigeração e/ou congelação. O peixe era disposto nos porões dos navios de pesca, em camadas horizontais sobrepostas, com a parte ventral virada para cima, distribuindo-se em cada exemplar uma certa quantidade de sal da região cefálica para a barbatana caudal (Botelho, 1954). O tempo de viagem correspondia ao tempo desta maturação em sal, que tanta influência tinha (e tem), na qualidade do bacalhau.

A troca de sal e água entre a matéria-prima e o meio ambiente depende da qualidade e quantidade do sal, procedimento, temperatura da salga e qualidade do peixe. Thórarinsdóttir (2010), salienta ainda a importância fundamental da condição do músculo e desnaturação das proteínas para o mecanismo de salga.

TIPOS DE SALGA

A salga pode ser realizada a seco (método de Kench) ou em salmoura (salga húmida) (Botelho, 1965a). Em qualquer dos métodos tecnológicos pode ser leve ou fraca, média ou medianamente fraca, ou forte. Esta subdivisão depende das percentagens de sal distribuído a seco, ou da concentração do sal na salmoura.

A salga seca adequa-se melhor aos peixes magros e a salmoura é indicada para os peixes gordos, os quais ficam protegidos do ar evitando a oxidação das gorduras e a consequente rancificação (Wheaton e Lawson, 1985).

O peixe escalado é bem envolvido com sal e colocado em camadas alternadas de sal e peixe. Para acelerar a saída da água, a pilha de peixe pode ser coberta com um plástico, ou uma tábua de madeira, sobre os quais se podem colocar pesos de modo a conseguir uma pressão uniforme de aproximadamente 250 kg/m² (Batista e Nunes, 1993).

A salga a seco é o método original no processamento do bacalhau salgado e o utilizado pelos portugueses. Neste método forma-se uma salmoura pela dissolução do sal na água superficial do peixe. O sal desloca-se da superfície para o interior, segundo o gradiente de concentração, no sentido oposto à água (Botelho, 1954; Thórarinsdóttir, 2010).

O sal actua normalmente durante 14 dias, o suficiente para o músculo ficar impregnado de sal e manter-se conservado por meses, mesmo sem refrigeração (Botelho, 1954).

A salga livre tem como principal desvantagem um menor rendimento em peso do produto final devido à maior perda de água (Botelho, 1954).

Na salmoura os peixes são mergulhados em água com sal grosso. Quando o peixe é envolvido por salmoura a taxa de penetração dentro do músculo do peixe é superior à obtida pela salga a seco.

A difusão do sal para o interior do músculo depende de vários factores, nomeadamente da composição da salmoura, da forma ou espessura do bacalhau, do tempo de imersão na salmoura e da razão entre o volume de salmoura e a quantidade de peixe. A temperatura deve ser mantida baixa, cerca de 2-4 °C, para minimizar o desenvolvimento microbiano (Thórarinsdóttir, 2010).

Se o grau de salinidade da salmoura for inferior ao grau de salinidade no interior do peixe, este começa a perder sal e a adquirir água, pelo que é necessário manter a salmoura em estado de saturação, para evitar que o bacalhau fique com deficiência de sal (Botelho, 1954; Thórarinsdóttir, 2010). Por outro lado uma salmoura com uma concentração de sal inferior à das salmouras saturadas, leva a um maior rendimento e a uma maior capacidade de retenção da água (Barat *et al.*, 2002).

A relação entre a concentração de sal, o ganho de peso e a solubilidade das proteínas do peixe (Figura 1.4) foi estudada por Duerr e Dyer (1952).

Os autores verificaram que havia um maior ganho de peso quando a salmoura apresentava inicialmente uma concentração de sal baixa, que ía sendo aumentada progressivamente, do que quando o peixe era mergulhado numa salmoura logo de início muito concentrada (> 6%). As diferenças observadas no rendimento de peso podem ser explicadas pelo efeito da entrada do sal, sobre as proteínas. Isto porque, a solubilidade das proteínas do bacalhau, sobretudo miosina, e o ganho de peso diminuem quando a concentração de sal no músculo supera os 5-6% de sal.

A concentração de sal na salmoura afecta a taxa de difusão do sal para o músculo e quantidade de água e proteínas extraídas. A extracção da proteína do músculo é função da concentração do sal com um máximo a 6-9% de sal. Baixas quantidades foram extraídas pela água pura ou com salmoura com concentração elevada. Isto é claramente uma influência de concentração sal/água nas ligações inter e intramoleculares da proteína muscular e vai afectar a estrutura e desnaturação de proteínas, assim como, a capacidade de retenção de água do músculo (Thórarinsdóttir *et al.*, 2004).

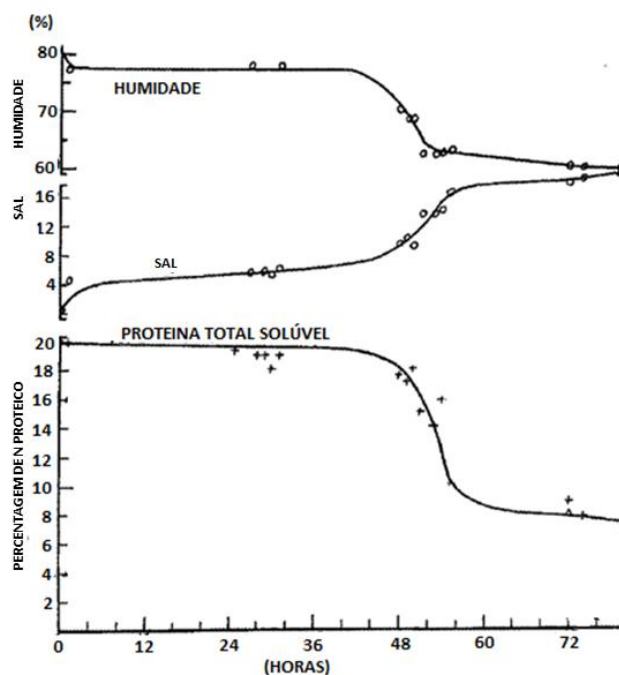


Figura 1.4 - Evolução da concentração de sal, humidade e proteína solúvel, em postas de bacalhau imersas em solução saturada de cloreto de sódio, a 0 °C (Fonte: Duerr e Dyer, 1952).

De acordo com Thorarinsdottir *et al.*, (2004), o efeito da concentração de sal da salmoura não deixa de ser um tema controverso. Estes autores procuraram avaliar o efeito de diferentes concentrações no rendimento, composição química (Figura 1.5) e capacidade de retenção da água em bacalhau salgado e demolhado, utilizando para este estudo dois tipos de salmoura. Uma com concentração elevada e constante (16 °Bau) ao longo do ensaio, e outra com uma concentração progressivamente maior. Verificaram não haver diferenças significativas.

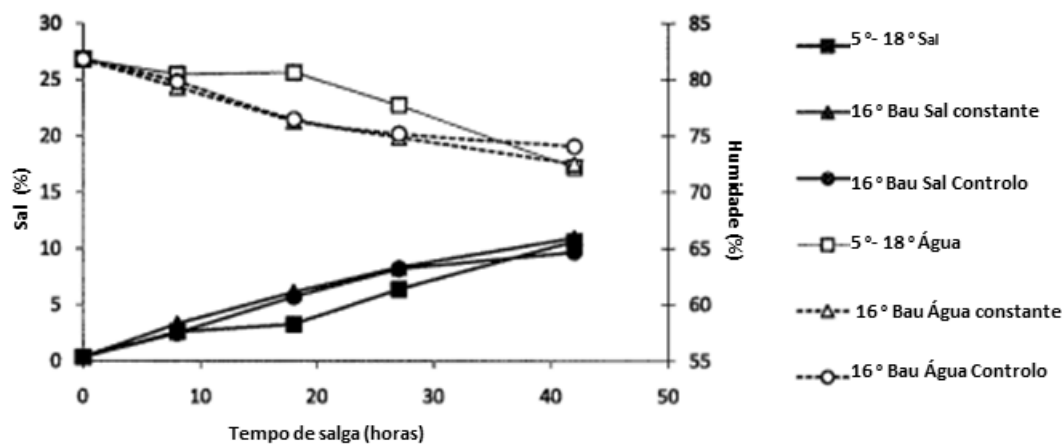


Figura 1.5 – Evolução da concentração de sal e humidade no músculo do bacalhau ao longo da salga em função de diferentes concentrações de salmoura (Fonte: Thorarinsdottir, 2010).

Contudo, noutro estudo similar (Gallart-Jornet *et al.*, 2007b), verificou-se que o rendimento depois da salga foi maior quando se utilizaram salmouras mais diluídas do que mais concentradas.

Outra forma de salga é por injeção de sal. Neste processo o sal penetra mais rapidamente no músculo, resultando uma concentração mais uniforme de sal no músculo.

A pressão de injeção e o número de injeções no peixe pode ser ajustado no equipamento automático de injeção. Usualmente a concentração aumenta de 0,15% no músculo do bacalhau fresco para 2-5% no músculo do bacalhau injectado final (Lauritzsen, 2004).

Este tipo de salga permite a adição de outros ingredientes como proteínas, mas só pode ser usada para adicionar pequenas quantidades de sal, devido à capacidade limitada de bombear o sal para dentro do músculo. O posterior tratamento do produto injectado e as condições de armazenagem influenciam a retenção do sal injectado. Existe um risco considerável de contaminação microbiana e de dano na estrutura do músculo, pela pressão aplicada e acção do equipamento de injeção usado (Thórarinsdóttir, 2010).

QUANTIDADE E QUALIDADE DO SAL

O sal conserva graças ao facto de levar à desidratação do alimento, pela diminuição da quantidade de água de constituição dos tecidos (Castro, 1946; Penso, 1953; Blesa 2007). Esta diminuição inibe a autólise (devido à desnaturação das proteínas) e o crescimento microbiano (Klaveren e Legendre; 1965 Barat *et al.*, 2003). A quantidade de sal que penetra nas células dos tecidos aumenta proporcionalmente à água que sai, acabando por substituir igual peso molecular da água expulsa dos tecidos (Castro, 1946).

Doses relativamente elevadas de sal funcionam como obstáculo ao desenvolvimento de microrganismos, contudo, há que ter em conta que existem microrganismos halófilos que se desenvolvem na água do mar (3% de NaCl) e no sal. Durante a evaporação de água nas salinas, estes microrganismos ficam depositados no sal, que serve de veículo de contaminação. Este grupo de microrganismos é responsável pela alteração vermelha do bacalhau (Castro, 1946; Penso, 1953).

O poder anti-séptico do sal é muito reduzido para as bactérias anaeróbias e nulo para as bactérias aeróbias estritas. A experiência indica que, se a concentração salina no interior

do bacalhau for superior a 4% a decomposição bacteriana é consideravelmente retardada e se for da ordem de 20% é extremamente lenta e o peixe não corre risco de alteração, desde que não seja exposto a temperaturas elevadas (Penso, 1953).

Quando em excesso, o sal pode ressequeir o peixe, “queimando-o”. A fracção não absorvida, ao separar as camadas superficiais do pescado, ocasiona a permanência de ar entre elas, o que conduz à oxidação da gordura, ou à multiplicação das bactérias halófilas. O aumento excessivo das fibras musculares deve-se à coagulação das substâncias proteicas. O peixe apresenta demasiada dureza, um aspecto de “ardido” ou “queimado” e uma tonalidade amarelo-palha (Castro, 1946; Botelho, 1954).

Por outro lado, quando o sal é insuficiente, a desidratação não se realiza convenientemente acarretando graves riscos durante a conservação a bordo ou prejudicando mesmo, a futura secagem e o valor do peixe depois de seco (Castro, 1946). A falta de sal, ao reduzir a desidratação, conduz a um produto mole pela fraca consistência das fibras musculares. Quando pressionado com os dedos fica com a marca das impressões digitais, parece borracha e pode apresentar um cheiro a alho (bacalhau aliáceo), e por vezes amoniacal (Moutinho, 1985; Botelho, 1954).

Na determinação da quantidade de sal a aplicar deve ter-se em consideração a qualidade desse sal, a espessura dos peixe e a pressão a que pode ser sujeito (Klaveren e Legendre, 1965).

Como é referido por Filipe (1999), a indústria utiliza em geral uma relação sal – bacalhau de 1:3. No caso concreto do bacalhau de cura tradicional portuguesa a AIB (2010), indica como quantidade suficiente cerca de 0,33 kg de sal para 1 kg de peixe.

A qualidade do sal é determinante no processo de cura. Comercialmente podem-se encontrar três origens de sal: sal marinho (obtido por evaporação da água do mar), sal obtido pela evaporação de água subterrânea e sal-gema.

O sal-gema nem sempre é inteiramente puro. Pode ser purificado até ser constituído por 100% de NaCl, mas este processo é dispendioso. As impurezas que o sal pode apresentar influenciam o resultado final de uma salga. Exceptuando o sulfato de cálcio, que sendo quase insolúvel praticamente não tem qualquer acção, os outros sais de cálcio e magnésio, mesmo em doses ínfimas, podem diminuir consideravelmente a permeabilidade das membranas celulares, porque têm a capacidade de endurecer os tecidos (Castro, 1946; Penso, 1953).

Quanto mais rico em cloreto de cálcio, ou em cloreto de magnésio, ou em sulfato de magnésio, menor a penetração do cloreto de sódio nos tecidos (Tressler e Lemon, 1951; Botelho, 1954; Blesa, 2007). Este dado é de grande importância, dado que a velocidade de penetração do sal nos tecidos está ligada à deterioração do peixe, sendo esta menor quando a velocidade é maior. A penetração do sal pode ser retardada pela presença de cloreto de magnésio. Este efeito é relevante, podendo afectar as fases iniciais do processo de salga quando o peixe é muito perecível e a quantidade de sal que penetra no músculo é inadequada à inibição da acção microbiana (Tressler e Lemon, 1951; Botelho, 1954).

Botelho (1965a) relata que Tressler efectuou experiências para averiguar de que forma diferentes sais, presentes no sal comercial, afectavam a velocidade de penetração do cloreto de sódio. O autor concluiu que, quando se empregava sal quimicamente puro os índices de cloreto de sódio, na parte superficial, intermédia, ou profunda do peixe, eram mais elevados. Verificou também, que o sulfato de sódio reduzia em menor proporção a penetração do cloreto de sódio, do que os cloretos de magnésio e de cálcio, verificando mesmo que 4,7% de cloreto de magnésio produzia um efeito semelhante a 1% de cloreto de cálcio. Este último sal retarda mais a penetração do cloreto de sódio no interior do pescado, do que os cloretos ou sulfatos de magnésio. Assim, as suas quantidades devem ser limitadas principalmente no que diz respeito ao cloreto, pois os sulfatos raramente se encontram em percentagens prejudiciais e são praticamente insolúveis. Soudan (1955), indica a composição mais razoável de impurezas do sal, como sendo 0,15-0,30% de Ca e 0,05-0,15% de Mg, com um rácio molecular Ca:Mg de 1,5 para 3.

Outro inconveniente do sal impuro é a sua grande higroscopicidade. Foi demonstrado que um sal com impurezas absorve mais humidade que um sal refinado, sendo que, este absorve 0,5% de humidade do ar envolvente, à temperatura ambiente (Tressler e Lemon, 1951). Assim, no caso do bacalhau salgado verde, se este for colocado em locais húmidos vai ficar sujeito a condições que favorecerão o desenvolvimento dos microrganismos halófilos, identificados como *Pseudomonas salinaria* e *Sarcina litoralis* (Wheaton e Lawson, 1985), responsáveis pela alteração denominada “rouge do bacalhau” (Botelho, 1954). Estas bactérias não são patogénicas mas prejudicam o valor comercial do bacalhau, podendo, contudo, ser eliminadas através de secagem do sal a 100 °C durante 30 min, ou aplicando ácido sulfuroso a 2% (Freixo, 1947).

Também o aspecto final do produto pode ser influenciado pela qualidade do sal. A utilização de 5% de cloreto de cálcio e 5% de cloreto de magnésio levam ao aparecimento de uma cor branca como giz (Boury, 1932). Este efeito na cor pode resultar do aumento da proteína precipitada devida à adição dos íões cálcio e magnésio (Lauritzsen e Olsen, 2004)

Utilizando um sal mais puro o bacalhau apresenta-se ligeiramente amarelado, translúcido, com uma rigidez mediana e um gosto normal a peixe. Após demolha e confecção exhibe uma cor semelhante à do produto de origem. Se for usado um sal que contenha cloreto de cálcio ou de magnésio, o bacalhau fica branco, opaco, com uma superfície rugosa e dura, mais resistente e com o sabor amargo característico (Botelho, 1954)

A coloração amarela ou acastanhada do sal pode indicar a presença de ferro. Este sal não deve ser utilizado no peixe pois 30 ppm de ferro e 0,2-0,4 ppm de cobre catalisam a formação de uma coloração castanha ou amarela no peixe salgado (Dyer e Gunnarsson, 1954).

A cura realizada com sal contendo 1,5% de cloreto de cálcio previne a coloração amarela que pode ocorrer ocasionalmente no bacalhau curado. No caso de este estar amarelo pode recorrer-se a uma imersão em 0,5% de solução de cloreto de cálcio para remover esta coloração (Legendre, 1955).

A utilização de cloreto de sódio puro leva à obtenção de um peixe salgado, mais flexível, de cor amarela âmbar, que depois de demolhado e cozinhado é praticamente idêntico à matéria-prima (Klaveren e Legendre, 1965).

Nos EUA, o sal da Califórnia, que contém normalmente 100% de cloreto de sódio, destinava-se à preparação do bacalhau amarelo. Na Terra Nova, este bacalhau amarelo era preparado para exportação para determinados destinos, como Portugal, em especial para o Porto e cidades nortenhas. Neste caso, porém, a tonalidade resultava do uso insuficiente de sal e, conseqüentemente, de uma deficiente preparação, que motivava já a degradação da matéria proteica com índices de azoto superiores aos do bacalhau nacional (Gonçalves Ferreira, 1951).

GRANULOMETRIA DO SAL

O tamanho do grão de sal é outro factor a ter em consideração. Como refere Castro (1946), quando demasiado grande dissolve-se lentamente e actua de forma irregular no

peixe, ou seja, actua mais nos pontos onde contacta, ocasionando uma penetração imperfeita. O sal de menor granulometria distribui-se mais uniformemente, penetra com uma maior rapidez inicial, fomentando a coagulação da proteína dos tecidos externos e dificultando assim, a penetração profunda.

O sal fino tem a vantagem de se dissolver rapidamente, mas é muito higroscópico. O sal com maior granulometria é menos solúvel e a penetração é retardada, possibilitando a actividade microbiana, que só é inibida quando o teor de sal no músculo atinge 5-6% (Ferreira, 1951).

De acordo com Castro (1946) e Botelho (1954), o melhor sal, para a salga do bacalhau, é o sal de cristais médios ou o sal traçado, por constituir uma mistura de sal fino e sal grosso. Esta combinação evita por um lado, uma desidratação muito rápida, como se observa na salga efectuada exclusivamente com sal fino, e por outro, uma desidratação muito lenta, como a que ocorre quando se emprega sal com cristais volumosos.

TEMPERATURA

A salga do pescado é feita a diversas temperaturas, consoante os países e os tipos de preparação. As temperaturas usualmente usadas vão de 0 a 37,5 °C (Ferreira, 1951).

A permeabilidade dos tecidos, possibilidade de desidratações e penetração do sal aumenta com a temperatura (Castro, 1946; Soudan, 1955). Contudo o aumento da temperatura fomenta os fenómenos de autólise, que provocam alteração do peixe. Se a velocidade destes fenómenos, activados pelo aquecimento, for superior à rapidez com que o sal penetra, o peixe deteriora-se em vez de se conservar (Botelho, 1965a).

Temperatura ambiente elevada ou manipulação inadequada podem causar amolecimento da carne, desenvolvimento de fendas e decomposição enzimática.

O amolecimento é devido sobretudo à proteólise. Nestas condições a carne tende a lascarse facilmente, apresenta-se mole e manifesta uma superfície rugosa depois da secagem. O estalar da carne do peixe, que ocorre nas regiões mais internas, expondo a carne à acção bacteriana, pode ocorrer também devido à salga inadequada (Castro, 1946).

Observando a quantidade de aminoácidos que se formam durante a salga, é possível seguir a rapidez e importância dos fenómenos de decomposição, a qual está relacionada com penetração do sal e forma como foram realizadas as operações antecedentes (Castro, 1946).

QUALIDADE DO PEIXE

A qualidade do peixe, que se traduz pela sua maior ou menor espessura e pelo seu maior ou menor índice de gordura, tem uma enorme influência na velocidade de penetração do sal, que varia na razão inversa da espessura e do índice de gordura (Ferreira, 1951).

A presença de pele abranda a penetração do cloreto de sódio, porque possivelmente obstrói a difusão do sal (Nguyen, *et al.*, 2010).

Ensaio efectuados com peixes salgados em salmouras a 0 °C, mostraram claramente que a transferência água – sal depende do índice de gordura. A prática tem demonstrado que peixes mais gordos salgam mais devagar do que os magros (Ferreira, 1951). Quanto mais gordura o peixe apresenta mais retardada é a expansão do sal para o interior, por causa da sua hidrofobicidade (Jason, 1965 *cit in* Gallart-Journet *et al.*, 2007a), embora o teor final de sal no interior seja independente da gordura (Soudan, 1955).

Como salienta Botelho (1954) é mais fácil conservar os peixes magros do que os gordos. O autor exemplifica comparando o bacalhau pescado na Terra Nova, bastante gordo e espesso, com o capturado na Gronelândia, magro e espesso, sendo que, o primeiro apresenta frequentemente alterações por salga deficiente.

A frescura do peixe também influencia a operação de salga e secagem. Uma matéria prima mais fresca resulta num rendimento global mais baixo e numa menor absorção de sal como foi demonstrado por Barat *et al.*, (2006).

CINÉTICA DA SALGA

Os principais elementos transferidos ao longo do processo de salga são água, sal, proteínas solúveis, pequenos péptidos e outros compostos azotados não proteicos (Thorarinsdottir, 2010).

Segundo Barat *et al.* (2004), o sistema é constituído por duas fases: uma “sólida”, constituída essencialmente pelas proteínas, e uma “líquida” onde a água é o solvente e o NaCl e os constituintes do músculo, sobretudo proteínas, os principais componentes. No caso do bacalhau salgado é considerada outra fase, constituída pelos cristais de sal que surgem à superfície, quando a fase líquida saturada perde água.

As forças envolvidas neste sistema são o gradiente de concentração dos componentes e o gradiente de pressão. Os mecanismos de transferência de massa associados a estas forças são a difusão ou osmose (Figura 1.6) e os mecanismos hidrodinâmicos, respectivamente. O gradiente de concentração dos componentes promove o transporte

de água, sal e proteínas solúveis. O gradiente de pressão promove o transporte em massa de solução (água mais solutos) por mecanismos hidrodinâmicos nos espaços intercelulares como uma consequência da reidratação do bacalhau.

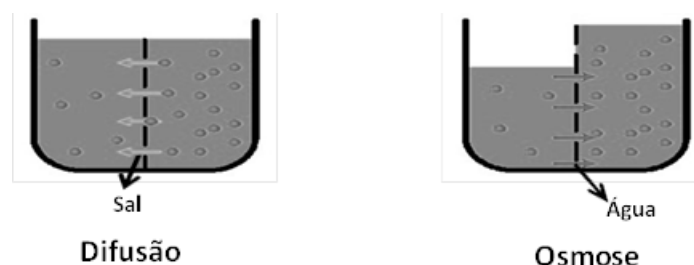


Figura 1.6 - Diagrama simplificado da transferência de massa por difusão e osmose
Adaptado de: Toltec International 2006 (http://www.toltec.biz/how_hemodialysis_works.htm).

Mesmo quando a salga não ocorre em salmoura, mas sim por salga seca, uma parte do sal dissolve-se por contacto com a humidade superficial do peixe, originando uma solução saturada. Por osmose as células superficiais, que estão em contacto com esta solução saturada, perdem água e impregnam-se de sal. Este processo propaga-se às camadas interiores (Penso, 1953).

Enquanto a concentração de NaCl no músculo se encontra na gama 2% a 5%, a água fica fortemente ligada aos constituintes proteicos, ocorrendo a dilatação do tecido (Duerr e Dyer, 1952). A baixa concentração de sal, o músculo incha, correspondendo a um aumento da hidratação proteica, ou seja, da capacidade de retenção da água, constituindo a fase designada por “salting-in” (Kinsella, 1982).

Quando a concentração no músculo atinge 9-10% a estrutura coloidal desaparece repentinamente. Esta concentração, responsável pelo desaparecimento da estrutura coloidal não é alterada pelos factores que influenciam a velocidade de penetração do sal, como a temperatura ou a concentração da salmoura exterior ou espessura do peixe. Estes podem contudo, abreviar ou retardar o tempo necessário para atingir o ponto crítico (Duerr e Dyer, 1952).

Acima de 9-10%, estabelecem-se ligações proteína-proteína mais fortes com retracções concomitantes do músculo e consequente desidratação - “salting-out” (Thorarinsdottir *et al.*, 2004).

Ocorre a fixação de iões salinos sobre a estrutura proteica, ocorrendo a modificação da carga eléctrica e por conseguinte a precipitação dos seus constituintes. A coagulação

resultante permite que o sal tenha acesso às camadas celulares interiores. As proteínas são desnaturadas, perdem a capacidade de se rehidratarem de forma reversível e de se solubilizarem. A ruptura da estrutura coloidal provoca o arrastamento da maior parte dos compostos azotados não proteicos (Botelho, 1965a).

De facto, ao analisar a salmoura Ferraro *et al.*, (2011) verificaram que, para além de sal, contém cerca de 0,5% de proteína solúvel e ainda uma quantidade apreciável de aminoácidos entre os quais a taurina (Figura 1.7), que tem como origem a cisteína. O elevado teor de taurina corresponde aproximadamente ao teor presente no músculo (Jones 1954, *cit in* Klaveren e Legendre, 1965), podendo assumir-se que pode ter sido libertado durante o processo de salga.

A salmoura que resulta da exsudação da água do peixe apresenta uma cor amarelada dourada e, num estado inicial, uma fluorescência verde se observada à luz ultravioleta. Este pigmento amarelo deve-se a reacções do tipo Maillard em que aminoácidos livres reagem com a ribose, que resulta da degradação enzimática dos nucleótidos (Tarr, 1955; Klaveren e Legendre, 1965).

A taurina parece ser uma das mais importantes fontes dos compostos Maillard na salmoura (Klaveren e Legendre, 1965).

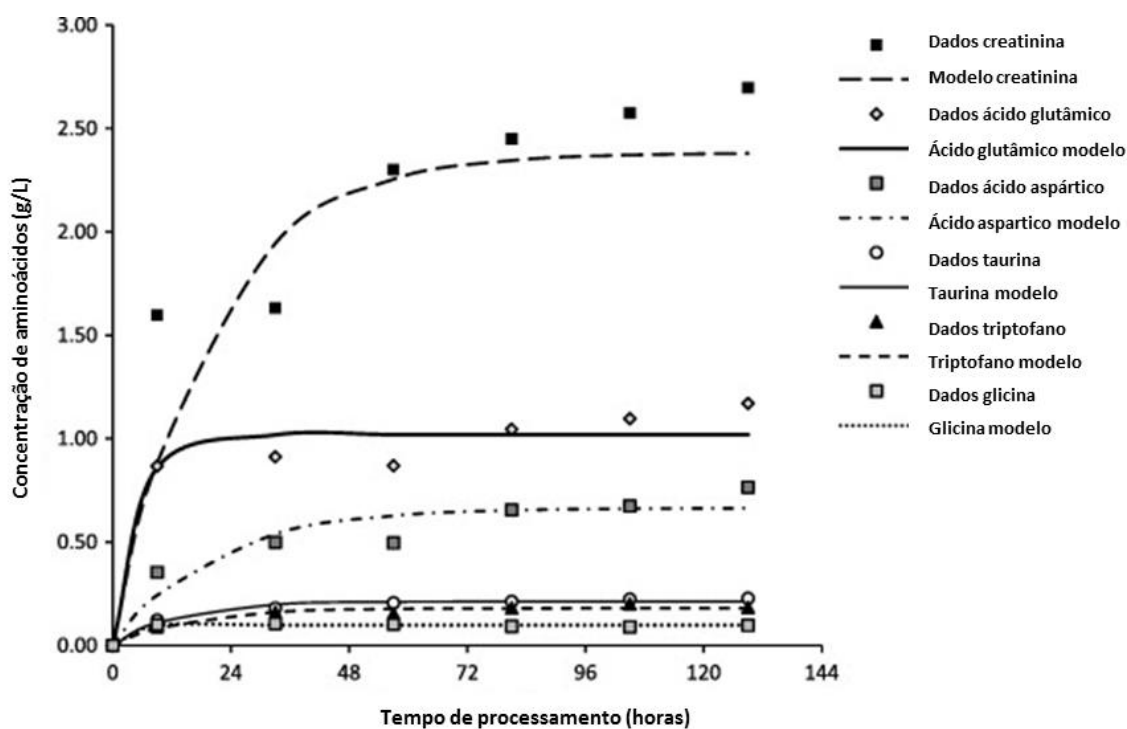


Figura 1.7 - Evolução da concentração dos principais aminoácidos na salmoura ao longo do processo de cura (Fonte: Ferraro *et al.*, 2011).

Com a concentração de sal acima dos 10% inicia-se a desnaturação das proteínas musculares, podendo-se formar por agregação complexos proteicos que, quando perdem a capacidade de dissolver, se designam por precipitados (Botelho, 1965a).

De acordo com Nguyen *et al.* (2010), a concentração de sal da salmoura afecta significativamente a transferência de massa e os parâmetros cinéticos durante a salga. Com a diminuição da concentração da salmoura, as variações no peso total e da água aumentam, enquanto as variações do peso de sal diminuem. Esta cinética está relacionada com as diferenças no gradiente de pressão, gradiente de concentração dos componentes e o grau de desnaturação proteica (Figura 1.8).

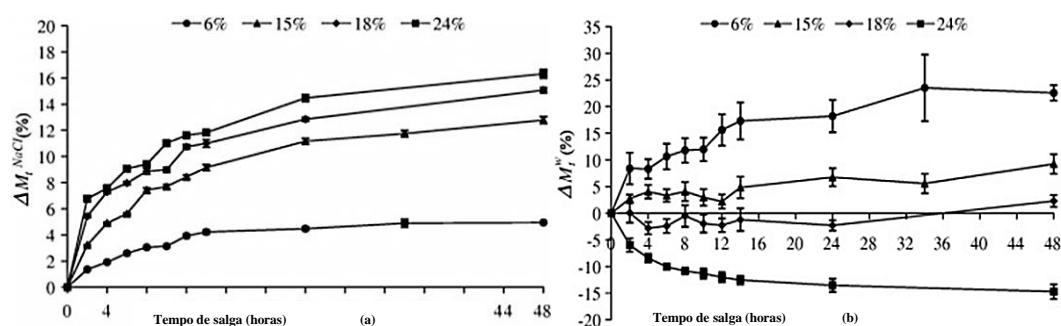


Figura 1.8 - Variação do sal (a) e da humidade (b) no lombo de bacalhau em função do tempo e concentração da salmoura. (●, 6%; ▲, 15%; ◆, 18% e ■, 24% (p/p)). Fonte: Nguyen *et al.* (2010).

Segundo Nguyen *et al.* (2010), o coeficiente de difusão mais elevado foi determinado em bacalhau salgado em salmoura com 15% (p/p) sugerindo que se trata da concentração crítica que separa os períodos de hidratação e desidratação na salga. Tal facto pode dever-se ao efeito do sal na microestrutura do músculo. O sal penetra no músculo devido ao gradiente de concentração, fluindo pelos espaços entre as fibras e depois na matriz intra-celular. Para valores mais elevados - 18 e 24% - forma-se uma barreira na superfície do peixe afectando a difusão (Nguyen *et al.*, 2010). A formação desta barreira pode ser devida ao rápido “salting-out”, ou seja, à interacção entre as regiões hidrofóbicas da proteína desidratada, na camada superficial do peixe. Um maior grau de desnaturação proteica leva a uma compactação do músculo que afecta a difusão do sal.

O aumento da temperatura e da concentração de sal no músculo do bacalhau, durante a salga, conduz a uma alteração da estrutura das proteínas tornando-as insolúveis. A proteína solúvel inicial é assim reduzida gradualmente até atingir um nível constante, o

que acontece ao fim de cerca de 18 dias. Este dado, cientificamente comprovado por Duerr e Dyer (1952) e Beatty e Fougère (1957), justifica a experiência empírica dos pescadores que mantêm o peixe muito salgado pelo menos 18 a 30 dias, pois quando salgado, durante períodos mais curtos, não se consegue separar a pele da carne. Esta situação indica que não foi atingido a desejável consistência (Fougère, 1952, *cit in* Klaveren e Legendre, 1965).

A massa do peixe aumenta ou diminui consoante a concentração de sal. Não ocorre alteração da massa quando a água perdida é igual à quantidade de sal que o peixe absorve. De acordo com Castro (1952) o valor de concentração limite de sal é 13%. Assim, quando é maior que 13% o peixe perde massa, pois a água que sai é superior ao sal que entra. Quando é menor que 13% o peixe aumenta de massa durante a salga. No final da salga o pescado recupera alguma massa devido à migração de sal do exterior para o músculo, como resposta à diminuição da concentração de sal neste. Esta diminuição deve-se à diluição da fase aquosa dos tecidos pela água que se liberta da proteína (Sainclivier, 1985).

MATURAÇÃO

O desenvolvimento da cor, aroma e sabor decorre durante a cura devido a reacções bioquímicas que ocorrem no músculo e que dependem dos processos de salga e condições de armazenamento (Penso,1953; Lauritzen, 2004; AIB, 2010).

A temperatura a que se desenrola a maturação depende do tipo de salga efectuada. Se for uma salga ligeira a maturação terá que ocorrer a 2 e 3 °C. Se for uma salga média pode ser a 16 °C e se for forte pode ser efectuada à temperatura ambiente (Penso,1953). De acordo com Penso (1953), no decorrer da maturação, o peixe salgado, em geral, é sujeito a diversos processos químicos e enzimáticos. Ocorre a degradação de albuminas e uma multiplicação considerável de microrganismos halófilos. A degradação da albumina deve-se sobretudo à actividade proteolítica das bactérias, mas também à acção de algumas proteases celulares do peixe, tal sucede especialmente na salga ligeira, a qual permite que estas enzimas se mantenham activas. Segundo o autor foi claramente demonstrado que os fenómenos de decomposição química e bacteriológica dependem da concentração de sal e da temperatura. Penso (1953), refere que se constatou que a

formação de bases voláteis se inicia somente quando o número de bactérias se encontra entre 1 e $2 \times 10^7/\text{cm}^3$ de músculo.

Bilinski e Fougère (1959) verificaram também que o azoto de trimetilamina decresceu na presença de 16% de NaCl durante pelo menos 15 dias e que teores de 8% inibiram a formação de indol, mesmo a temperaturas de 25 °C.

Segundo Lauritzsen (2004), o aumento da concentração de NaCl faz diminuir o pH do músculo, fomentando a actividade de algumas proteases, como as catépsinas que apresentam uma actividade óptima a pH ácido alterando, desta forma, a fracção proteica do peixe curado.

Quando o pH do meio coincide com o ponto isoeléctrico das proteínas, que é cerca de 5 no caso da actina e miosina, as interacções electrostáticas proteína-proteína são máximas e a capacidade de retenção da água é mínima. Se o valor de pH for superior ou inferior as proteínas adquirem a mesma carga e repelem-se aumentando o espaço entre filamentos e aumenta a capacidade de retenção da água (Rodrigues, 2006).

Nesta fase, a AIB (2010) recomenda, para o bacalhau de cura tradicional, a permanência do peixe durante um período mínimo de 30 dias a uma temperatura de cerca de 4 °C e a uma humidade relativa do ar entre 80 e 85%.

1.4.3. Secagem e armazenamento

SECAGEM

A secagem tem o objectivo de remover grande parte da água da constituição dos tecidos, que não foi eliminada pela salga, permitindo aumentar o potencial de conservação do peixe.

Como afirmava Botelho (1948), se um produto chega mal preparado ao secadouro, já não é possível transformá-lo num bom produto, quer sob o ponto de vista comercial, quer sob o ponto de vista higiénico. A salga insuficiente a bordo era, segundo este autor, uma das causas principais de alteração precoce do peixe.

A lavagem é o primeiro passo a ser realizado para retirar o excesso de sal superficial e restos de coágulos ou vísceras, que não foram retirados previamente. Após esta operação o peixe é colocado a escorrer de forma a não chegar ao secadouro embebido em água, até porque a desagregação das fibras musculares é tanto mais intensa, quanto maior quantidade de água houver nas células (Botelho, 1948; Freixo, 1947).

A secagem pode ser feita pela exposição ao ar livre ou em estufas por processos mecânicos, que permitem aferir e controlar a temperatura e a humidade relativa do ar.

SECA NATURAL

Na secagem ao ar livre, o peixe é colocado sobre ripas ou arames com a face ventral para cima, sendo por vezes necessário virar os peixes ou colocar cunhas de madeira por baixo das barbatanas peitorais, para activar a secagem (Castro, 1946; Freixo, 1947). Eventualmente a secagem também pode ser realizada, pendurando o peixe pela cauda, sobretudo no caso de pequenos peixes. O peixe é colocado durante o dia e recolhido ao entardecer, sempre que as condições meteorológicas o justifiquem. Dependendo da origem do bacalhau, da intensidade dos ventos e do calor solar, a secagem pode durar entre 4 e 6 dias (Castro, 1946).

A secagem deve ser alternada com empilhamento, para permitir a dispersão da água da constituição celular, por toda a extensão do peixe e facultar posteriormente uma evaporação mais uniforme (Freixo, 1947; Botelho, 1948).

As condições atmosféricas mais adequadas correspondem a temperaturas amenas, entre 15 e 26 °C, e ar com uma humidade relativa ao redor de 70%, sendo conveniente a existência de ventos moderados, do quadrante norte, no caso de Portugal (Freixo, 1947). Dadas as características do nosso clima o bacalhau não pode ser seco com regularidade, sendo a estação mais propícia a Primavera. No Verão, o excesso de calor pode queimar as fibras musculares, criando pontos de menor resistência à actividade microbiana. No Inverno o principal cuidado deve ser evitar a chuva, pois leva a um atraso na secagem e a um aumento da predisposição para futuras alterações. Colocar o peixe a secar em dias muito húmidos é inútil devido ao equilíbrio entre a humidade interna e a atmosférica (Botelho, 1948).

Para fazer face à irregularidade do clima português, em meados do século XX, segundo Botelho (1948), os industriais efectuavam a lavagem de grandes quantidades de peixe de modo a tê-lo preparado para secagem quando o tempo o permitia. Esta situação comprometia a conservação originando, em alguns casos, a necessidade de ressalga. Este lavar e ressalgar praticamente diário, fomentava o problema do “avermelhamento”.

Para obter um produto em boas condições sanitárias e com um bom valor comercial, Botelho (1948) sugeria refrigerar o peixe verde, lavar mecanicamente e realizar uma secagem mista.

De acordo com Freixo (1947), as características que um peixe bem seco deve apresentar são: rigidez das fibras musculares das regiões laterais da espinal medula e cefálica, que não cedem à pressão exercida pelos dedos; ausência de flexões quando ao pegar-se pela extremidade caudal se colocam verticalmente; quando percutidos com as articulações dos dedos, dão um toque peculiar.

Todavia, já na sua época o autor alertava para o facto de por vezes se cair no erro de considerar um peixe bem seco, quando na realidade ainda apresentava um elevado teor de água, realçando a vantagem da confirmação laboratorial. Por esta razão foram estipulados pelas entidades competentes (a CRCB na altura), valores limites de humidade para a classificação de um lote de bacalhau.

A salga natural é um processo que envolve muita mão-de-obra, é moroso e as condições não são facilmente controladas (Duarte, 2001).

SECA ARTIFICIAL

O processo de secagem artificial é efectuado em túnel de secagem. Citando vários estudos, sobretudo oriundos do Canadá e terra Nova, Botelho (1948), indica que as melhores condições de secagem artificial são 1 a 2 m/s de velocidade do ar, 16 a 26 °C de temperatura ambiente e 45 a 55% de humidade relativa.

Mais recentemente são referidas temperaturas entre 20 e 26 °C (Filipe, 1999), que são as utilizadas em Portugal, e humidades relativas do ar de 50-65% (Andrés *et al.*, 2005). A secagem muito rápida favorece a formação de cristais impermeáveis à superfície do bacalhau impossibilitando a secagem posterior. Quando superior a 2 m/s, ou seja, quando a velocidade de evaporação é muito superior à de dispersão da água de constituição do peixe, surgem defeitos como dureza excessiva, superfície com aspecto muito fibroso, desigual e com cristais de sal (Botelho, 1948).

De acordo com Botelho (1948) é recomendável o empilhamento do peixe na secagem mecânica, entre as fases iniciais e finais desta, o que, à semelhança do que já havia sido descrito para a secagem natural, vai permitir uma dispersão da água interna do peixe, favorecendo uma secagem uniforme.

Ainda segundo o citado autor, apesar das oscilações das percentagens de humidade serem menos perigosas do que as de temperatura, devem ser respeitados os limites indicados, de forma a estabelecer o equilíbrio na evaporação e evitar o desenvolvimento de fendas, sobretudo quando se utilizam valores muito baixos.

O tempo de secagem varia entre 48 e 60 h (Filipe, 1999), podendo estender-se até às 96 h dependendo do tempo de salga a que o bacalhau foi sujeito e do tamanho deste, devendo ser descontínua, ou seja com períodos de repouso (AIB, 2010).

ARMAZENAMENTO

Durante o armazenamento, tendo em conta a actividade enzimática, microbiana e não microbiana, que existe apesar da elevada concentração de sal e baixas temperaturas, é indispensável controlar a temperatura e a humidade, para manter a estabilidade dos parâmetros de qualidade do produto. De forma a minimizar as alterações de peso é necessário um equilíbrio entre a actividade da água no peixe salgado e a humidade relativa do ambiente (Thorarinsdottir, 2010).

O peixe salgado depois de seco é devidamente acondicionado e colocado sobre paletes em câmara de refrigeração, a uma temperatura entre 2 e 4 °C e uma humidade relativa do ar entre 55 e 60%, permanecendo em maturação (AIB, 2010). No caso do bacalhau de cura tradicional portuguesa este período não deve ser inferior a 90 dias (AIB, 2010).

1.5. O processo de cura amarela

Nas províncias canadianas localizadas perto da Península de Gaspé as condições climáticas caracterizadas por ventos de noroeste, temperatura inferior a 24 °C e a humidade relativa inferior a 80%, são favoráveis à salga leve (correspondente à cura amarela), que confere apenas 14-18% de sal ao produto final seco. Os valores de temperatura e humidade podem ser superiores durante os meses de Julho e Agosto, o que faz com que neste período se possam usar maiores concentrações de sal. Os países mediterrânicos como Portugal, Espanha e Itália sempre foram os principais importadores deste tipo de produto (Klaveren e Legendre, 1965).

Actualmente definiram-se normas de comercialização para o bacalhau e espécies afins, salgados verdes e secos, tendo em conta designadamente a evolução dos processos tecnológicos de fabrico, que constam do Decreto Lei nº 25/2005 de 28 de Janeiro, e que

permitem estabelecer algumas diferenças entre os produtos de cura amarela e os restantes, como se encontra ilustrado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Características de humidade e teor de sal do bacalhau salgado verde, salgado seco e de cura amarela (Fontes: (1) Decreto Lei nº 25/2005 de 28 de Janeiro; (2) Thorarinsdottir, 2010).

| Bacalhau | Humidade(%) | Teor de sal (%) | Outras características |
|------------------------------|--------------|-----------------|------------------------------|
| Fresco ⁽²⁾ | 80 - 82 | 0,2 - 0,3 | |
| Salgado verde ⁽¹⁾ | 51 - 58 | ≥ 16 | |
| Salgado seco ⁽¹⁾ | ≤ 47 | ≥ 16 | |
| Cura amarela ⁽¹⁾ | ≤ 45 | 12 - 16 | Coloração amarelada âmbar |
| Demolhado ⁽²⁾ | 82 - 84 | 0,9 - 1,5 | |
| Extra seco ⁽²⁾ | 30 - 35 | 23 - 25 | |

A preparação do bacalhau de tipo amarelo em Portugal adveio do conhecimento que alguns armadores e pessoal especializado tinham do método utilizado na Terra Nova, que conferia ao peixe salgado a tonalidade amarelo âmbar e a sensação de não ter muito sal (Castro, 1958).

Em Portugal chegou-se a obter um produto quase igual ao importado da Terra-Nova. O método consistia principalmente em submeter o pescado a uma demolha e enxugo, após a lavagem. O peixe assim curado era preferido sobretudo na região norte do país, sendo famoso o denominado “bacalhau de Viena²”. A sul, principalmente em Lisboa, os consumidores elegiam o de cura branca chamado impropriamente “Sueco”.

Todavia, o bacalhau de cura amarela passou a ser preterido ao bacalhau de cura branca, devido a uma preferência ligada à mudança de costumes e hábitos, mas também ao facto de no processo da cura branca haver uma menor quebra de peso e, consequentemente, um maior rendimento económico (Castro, 1958).

Foram descritos três tipos de preparação de bacalhau por Botelho (1953a, 1965b): tipo Amarelo ou «Inglês», Branco ou «Norueguês» e «Nacional» ou canadiano.

Todos estes tipos apresentam em comum a fase de lavagem, com água doce ou salgada consoante o que se pretende obter (Figura 1.9).

No que concerne à fase de lavagem, o autor salienta a obrigatoriedade de se efectuarem análises microbiológicas à água de lavagem, assim como o controlo da limpeza do peixe

² Castro (1958) refere bacalhau de “Viena” no texto original, poderá no entanto tratar-se de bacalhau de “Viana”

em relação a restos de sangue, vísceras, sujidades aderentes às barbatanas e rugosidades da pele dos peixes, e excesso de cristais de sal à superfície. Isto devido ao elevado risco destas sujidades e impurezas do sal se infiltrarem profundamente no peixe curado e seco, ou de se acumularem nos porões. O autor refere ainda que, se o peixe for sujeito a longos períodos de refrigeração, o que se encontra na periferia das pilhas acaba por ficar seco e desidratado, causando maiores dificuldades no que concerne a uma lavagem satisfatória.

A cura branca é indicada para peixes que foram insuficientemente salgados a bordo. Depois de se conseguir uma penetração complementar de 2 a 3% de sal no interior dos tecidos, o peixe é colocado em salmoura ocorrendo como consequência um aumento da concentração salina de 5 - 7% e um aumento dos sais de cálcio e magnésio, que conferem uma coloração mais branca ao peixe.

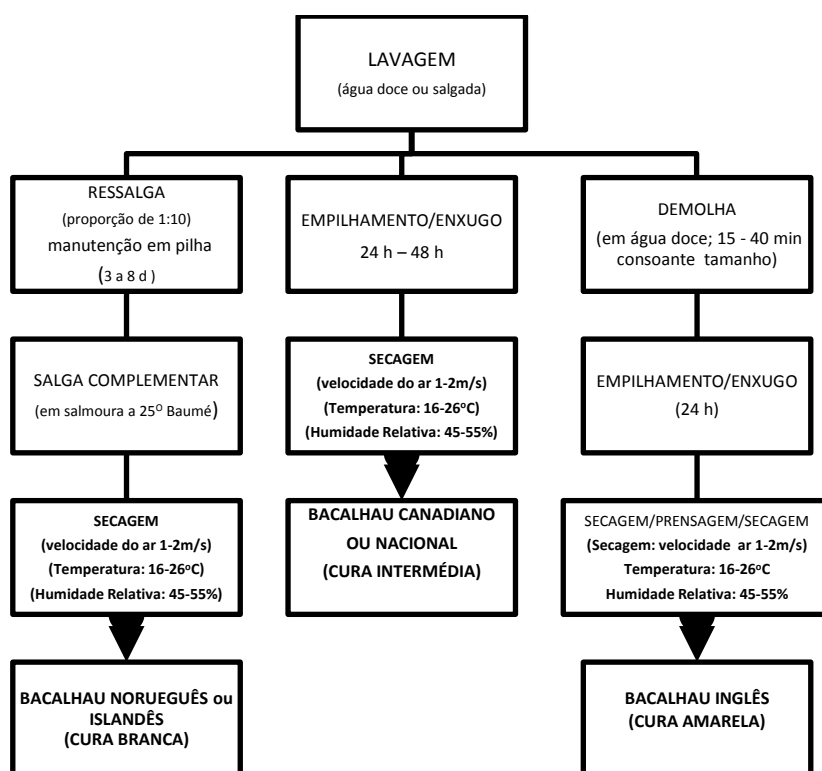


Figura 1.9 - Processos de obtenção de Bacalhau tipo “Cura Branca”, tipo “Nacional” e tipo “Inglês”, a partir da fase comum de lavagem (Botelho, 1948, 1953a, 1965b; Castro, 1946).

De acordo com Botelho (1956b), esta cura deve aplicar-se sobretudo ao peixe que já apresenta uma certa alteração proteica “pela actividade de elementos biológicos”³, ou no peixe salgado que não tem o tempo de maturação suficiente, ou seja, ao último peixe

³ Termo utilizado pelo autor no documento original

pescado. O peixe sujeito a esta cura é mais branco graças aos sais de cálcio e magnésio, apresentando-se todavia mais húmido, uma vez que não se consegue uma secagem tão intensa, dada a dificuldade em evaporar a água do interior, devido à barreira criada pela acumulação dos sais à superfície. A proteína é menos concentrada, mas apresenta um aspecto comercial apelativo, o que explica a grande aceitação deste produto no sul do país (Botelho, 1965b).

A quebra no rendimento do bacalhau obtido por este processo de cura branca, é reduzida quando comparada com o das curas Amarela e «Nacional», situando-se nos 25%, o que valoriza comercialmente este produto. A maior desvantagem é a predisposição para a alteração vermelha ocasionada pelo desenvolvimento de bactérias halófilas, em condições de temperatura e humidade elevadas.

Em relação ao bacalhau tipo «Nacional», o processo implica um menor teor de sal e por conseguinte um menor risco de alteração vermelha. Isto contribui para aumentar o seu poder de conservação, mantendo-se assim, refrigerado ou não, por 40 dias, sendo a sua secagem mais rápida e o valor de humidade final mais baixo (Botelho, 1965b).

Na preparação do tipo Amarelo a demolha tem como objectivo remover o sal, proveniente da salga efectuada a bordo, baixando a sua percentagem para um valor inferior a 19%. Esta etapa funciona como profilaxia à alteração vermelha.

Com este tipo de cura, a concentração de 20% de sal, que o peixe salgado verde normalmente apresenta no interior dos tecidos, baixa para cerca de 17,5% após a demolha (Botelho, 1965b).

A designação de tipo Amarelo provém da coloração que o peixe adquire depois de seco, sendo também designado por «Inglês» por se assemelhar ao preparado na Terra Nova, outrora colónia inglesa.

Nos secadouros nacionais optava-se por esta cura quando era necessário resistir durante mais tempo a condições favoráveis ao desenvolvimento da alteração vermelha (Botelho, 1953a; Botelho, 1965b).

1.5.1. Secagem do bacalhau de cura amarela (Gaspé)

De acordo com Klaveren e Legendre, (1965), o bacalhau de cura amarela devido ao menor teor de sal, deve ser submetido a secagem logo após a salga, para evitar o

desenvolvimento de “slime”⁴ de origem microbiana. No caso de não ser possível, então o peixe deverá ser mantido a temperaturas de -1 a 8 °C, durante um máximo de 6 a 8 dias.

A secagem do bacalhau deste tipo é conseguida em menos tempo, podendo-se levar o grau de cura a um estado mais elevado, o que se traduz num produto menos salgado, menos húmido, menos rugoso, mais maleável, mais escuro, amarelado apresentando uma percentagem de proteína mais elevada e concentrada como consequência da maior desidratação (Botelho, 1953a; Botelho 1965b).

Antes da década de 50, do século XX, este tipo de cura, efectuada nos secadouros nacionais resultava em grandes perdas do produto, pelo facto das instalações não terem condições apropriadas. Assim, quando as condições de temperatura e humidade não eram próprias para a secagem natural, o peixe curado desta forma, tendo um teor baixo de sal ficava propenso à deterioração microbiana, sobretudo por estafilococos. Formava-se superficialmente uma camada viscosa do tipo bacteriano, depois de alguns dias de demoradia, acompanhado por um aumento do pH (Botelho, 1953a; Botelho 1965b).

Como já foi anteriormente referido, a secagem natural é um processo moroso que depende exclusivamente das condições climatéricas, que nem sempre são favoráveis. A secagem artificial constitui uma alternativa, mas nem sempre era bem conduzida, dado que, ao aplicar-se à salga leve (que caracteriza a cura Gaspé), o processo desenvolvido para o produto salgado seco, usando equipamento desenhado para a secagem deste último, dava origem a grandes perdas de rendimento e produtos de baixa qualidade (Legendre, 1955).

Para obviar esta situação foram estudados três factores essenciais no que diz respeito à salga e secagem de bacalhau: temperatura, velocidade de circulação do ar e humidade relativa (Figuras 1.10, 1.11 e 1.12).

Com estes estudos foi possível traçar curvas de evaporação de água. Verificou-se que a taxa de evaporação aumenta com o valor da temperatura (Figura 1.10), sendo apontado o valor 80 F (26,7 °C), como correspondendo à temperatura mais alta a que se pode sujeitar o produto durante a secagem, sem causar dano (Legendre, 1955).

⁴ O “slime” é referido na bibliografia, também por muco, inducto viscoso, baba, goma e reima, sendo que, no presente trabalho adoptou-se por esta última designação, sempre que corresponde uma substância viscosa, observada durante o processo de preparação e/ou armazenamento do bacalhau. Na referência ao muco superficial do peixe fresco optou-se por manter o termo “slime”.

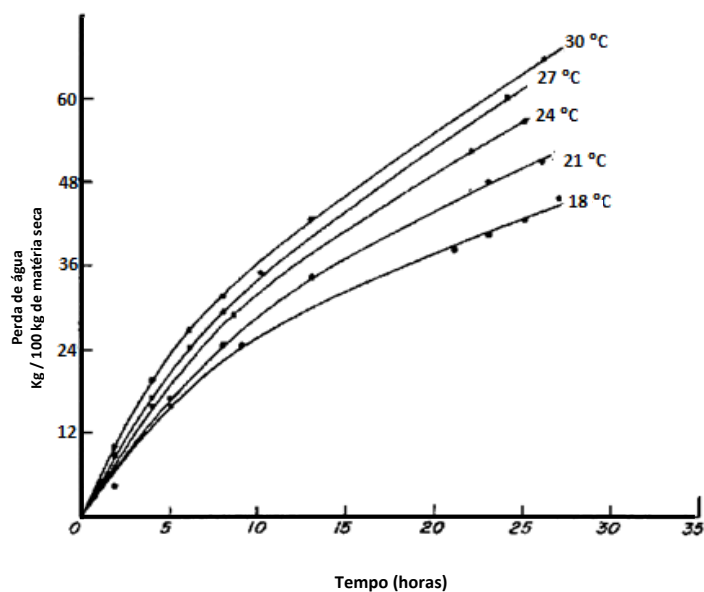


Figura 1.10 - Curva da perda de água, durante a secagem do bacalhau de cura Gaspé, em função da temperatura: humidade 55%; velocidade de circulação do ar 92 m/min (Fonte: Legendre, 1955).

Relativamente à circulação do ar, maior velocidade implica uma melhor distribuição da temperatura possibilitando uma secagem mais uniforme (Figura 1.11). Se a velocidade é baixa a secagem é lenta o que ligado a uma temperatura favorável, permite uma superfície húmida, favorecendo a multiplicação de microrganismos com formação de reima (Legendre, 1955). Com velocidades da ordem dos 93-124 m /min pretende-se a formação de uma película seca à superfície para evitar a reima.

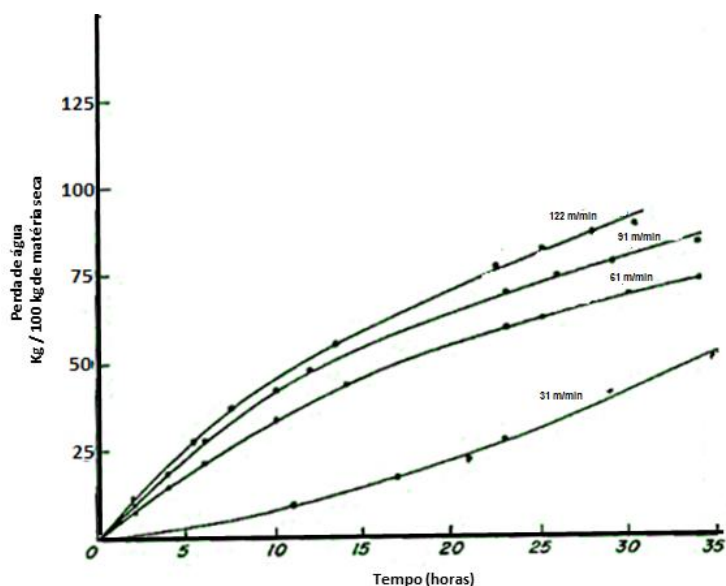


Figura 1.11 - Curva da perda de água, durante a secagem do bacalhau de cura Gaspé, em função da velocidade de circulação do ar: temperatura de 26,7 °C; humidade 55% (Fonte: Legendre, 1955).

A humidade relativa é outro factor a ter em consideração (Figura 1.12). Enquanto a superfície do peixe se mantém húmida, a humidade relativa influencia a taxa de secagem.

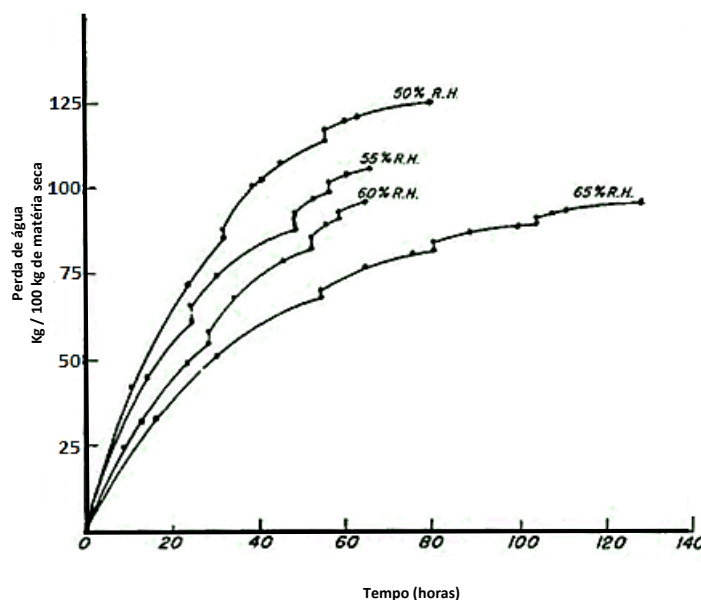


Figura 1.12 - Curva da perda de água, durante a secagem do bacalhau de cura Gaspé, em função da humidade relativa: temperatura de 26,7 °C; velocidade de circulação do ar 92 m/min (Fonte: Legendre, 1955).

O tempo requerido para a secagem é assim, consideravelmente reduzido por operações sucessivas de secagem e prensagem. Sempre que há uma prensagem, a água que se difunde do interior para a superfície, evapora de forma fácil e rápida no início da fase de secagem posterior, o que se traduz num incremento da taxa de secagem, no início de cada um desses períodos de secagem. Se há uma distribuição não uniforme da água, a superfície pode apresentar uma secagem intensa, antes de atingir o teor de água característico deste produto. Em consequência a superfície do peixe estala.

Desta forma confirma-se que uma secagem alternada com períodos de prensagem torna-se mais eficiente do que uma secagem contínua e, simultaneamente, promove uma distribuição uniforme da água, que se reflecte num produto final de melhor qualidade (Legendre, 1955).

Durante o processo de prensagem as condições ambientais também são de grande importância, sendo que humidades relativas superiores a 70% devem ser evitadas, para não ocorrer condensação à superfície do peixe, e as temperaturas devem manter-se entre

12,7 °C e 15,5 °C. Temperaturas inferiores retardam a taxa de difusão da água, do interior para a superfície, e superiores favorecem o desenvolvimento microbiano (Legendre, 1955).

A fase de prensagem deve prolongar-se pelo tempo necessário até que a superfície do peixe apresente alguma exsudação e para que esta seja uniforme a pilha dos peixes deve ser re-empilhada com alguma frequência, pois a taxa de difusão aumenta com a pressão. Este processo fomenta a formação de uma fina camada de sal que melhora bastante o aspecto final do produto (Legendre, 1955).

1.5.2. Mecanismos bioquímicos e microbiológicos da cura amarela

O processo de cura amarela do bacalhau suscitou grande interesse por parte de alguns investigadores portugueses, ligados ao sector do bacalhau, durante a década de 50 do século XX. Um destes investigadores foi Castro (1958) que procurou conhecer um pouco mais este produto. Esta curiosidade foi despertada possivelmente após uma visita efectuada à Estação de Tecnologia de produtos Marinhos da “Gaspésie”. Nesta visita teve acesso aos estudos relacionados com o bacalhau de cura Gaspé, que estavam a ser levados a cabo sob orientação do Dr. Nadeau.

Os ensaios permitiram observar a evolução do peixe ao longo deste processo de cura, partindo de um teor inicial de NaCl de 20%. Verificou-se a formação de substâncias voláteis cujo teor aumentou até ao início da secagem, diminuindo aquando desta e permanecendo constante até ao produto final. Foi possível ainda desenvolver experiências associando diferentes valores de temperatura e humidade ambiental, por forma a determinar a temperatura e humidade relativa máxima, nas quais o peixe salgado e seco possa ser conservado sem alteração, utilizando peixes salgados cuja humidade varia entre 28 a 40%. Nas condições do ensaio, primeiro notou-se uma ligeira cozedura, na qual o pescado perdeu a sua rigidez, e depois observou-se a abertura de fendas. Verificou-se que este fenómeno era independente do conteúdo em água e em sal, mas dependente da temperatura ambiente, revelando-se mais acentuado com o prolongamento da armazenagem às temperaturas testadas de 32 a 35 °C. A superfície do peixe ganhou em seguida uma coloração amarelada, tornando-se a pele pegadiça e húmida, facto este influenciado pela percentagem de água no peixe, na medida em que quanto maior o teor de água mais rapidamente o peixe se apresenta humedecido e pegajoso. Foram efectuados também análises microbiológicas que permitiram

reconhecer a presença de 21% de bactérias proteolíticas existentes no peixe, relativamente ao total de estirpes isoladas. Algumas destas estirpes foram identificadas verificando-se que pertenciam à família das *Micrococaceae*, apresentando a capacidade de liquefazer a gelatina, reduzir o óxido de trimetilamina e tolerar até 10% de sal.

Foi desenvolvido um estudo por Castro (1958), com o intuito de determinar qual o tempo e forma de demolha mais adequados à obtenção de um bom produto e averiguar se, o surgimento de uma substância viscosa e acastanhada na superfície, vulgarmente designada por baba (correspondente ao termo reima como referido), seria necessário para que houvesse a verdadeira cura.

De acordo com as suas experiências, o autor indicava como método preferencial um processo iniciado por uma lavagem, prensagem, enxugo, uma demolha de duas horas, com uma troca de água, ao fim da primeira hora, seguida de novo enxugo, de três dias, e finalizar com secagem de pelo menos 5 dias. Referia ainda que a reima, surgida eventualmente durante o segundo enxugo, devia ser evitada com uma secagem ou refrigeração (2 a 5 °C). Segundo o autor, a reima não tinha qualquer significado quanto à obtenção da cura amarela pois apenas dependia das bactérias que se encontravam no peixe e da temperatura e humidade deste, acrescentando que as zonas atingidas ficavam com péssimo aspecto e sabor desagradável. Contudo, aquilo a que o autor denomina péssimo aspecto é uma tonalidade amarela mais intensa, próximo do castanho.

O aparecimento desta reima no peixe com falta de sal, como o de preparação do tipo amarelo, também foi referido por Moutinho (1985); O autor informa que as pesquisas bacteriológicas efectuadas neste tipo de produto têm explicado a hidrólise produzida pelos microrganismos proteolíticos, estafilococos em particular, que, graças à secreção de uma enzima com actividade proteolítica mesmo no limite de temperatura de 10 °C, levam a alteração do produto, isto é, a putrefacção superficial.

A determinação do azoto proteico, do azoto dos aminoácidos livres e do azoto de trimetilamina (N-TMA), em diversas amostras de bacalhau com diferentes tipos de cura, demonstrou uma tendência do bacalhau fortemente salgado seco para apresentar valores inferiores ao do bacalhau de cura Gaspé. Isto pode estar relacionado com a diferença dos índices bacterianos das salmouras destes dois tipos de produto salgado (Klaveren e Legendre, 1965).

Como já foi descrito, a carne do bacalhau é bastante magra, contendo apenas 3,5% de matéria gorda (em matéria seca), podendo ser hidrolisada por lipases. Comparando a taxa de hidrólise entre a cura do bacalhau fortemente salgado e a cura do bacalhau de salga leve (cura Gaspé), constata-se que esta é diferente, embora a quantidade de ácidos gordos produzidos no final da cura seja aproximadamente idêntica. Assim, enquanto no de salga leve (correspondente à cura amarela) os ácidos gordos livres aumentam gradualmente em cada passo do processo, no fortemente salgado esta quantidade aumenta rapidamente durante os primeiros 10 dias de salga, mantendo-se até ao final. Verifica-se assim, que o sal não inibe as enzimas responsáveis pela lipólise que leva à libertação dos ácidos gordos do grupo dos fosfolípidos (Cardin *et al.*, 1958).

Durante a preparação do bacalhau de cura Gaspé, cerca de 77% dos ácidos gordos é libertado dos fosfolípidos. Cerca de 57% dos ácidos gordos livres pertencem aos grupos C20 e C22 que são altamente insaturados. Os ácidos gordos insaturados estão sujeitos a decomposição oxidativa. As substâncias resultantes, a maior parte cetonas e aldeídos, parecem ser responsáveis pelo *flavour* e provavelmente pelo sabor do bacalhau salgado (Klaveren e Legendre, 1965; Lauritzsen, 2004).

Moutinho (1985), refere que a observação microscópica de cortes a partir de amostras de bacalhau com falta de sal, apresentando elementos corados de amarelo permite visualizar estafilococos. Tendo em conta as características destes microrganismos, o autor relaciona-os, como já foi referido, com o fenómeno por vezes verificado nas pilhas de peixe formadas nos armazéns das secas, sobretudo em certas condições de preparação do tipo amarelo.

Dussault (1953) foi um dos raros autores que estudou com maior pormenor a flora bacteriana da superfície do bacalhau de cura amarela. Verificou que durante os primeiros dias de cura ocorria um crescimento pronunciado de 10^4 para 10^5 cél./cm² da superfície, seguido de um gradual declínio durante a secagem. Mais de 90% desta microbiota era formada por micrococos e a restante pelos géneros *Flavobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Sarcina*. Por outro lado, no peixe fresco não salgado apenas 40% da flora bacteriana era constituída por micrococos. O mesmo autor (1958) analisou em detalhe 22 estirpes, deste grupo bacteriano, isoladas ao longo do processo de cura e constatou que todas elas se desenvolviam bem a 8% e nenhuma a 12% de NaCl. Muitas exibiam uma crescente actividade proteolítica (evidenciada por zonas transparentes em agar de sal e leite), até um máximo a 2% de sal e nula actividade a 12%. O autor

observou, ainda, que cerca de metade das estirpes estudadas reduziam a óxido de trimetilamina (OTMA), sendo a taxa de redução pouco alterada até 4% de NaCl, mas, à medida que a concentração de sal aumentava, esta taxa tendia para zero. Dussault (1958) inferiu, com base nos resultados obtidos, que o aroma e sabor característicos do bacalhau de cura amarela resultariam, assim, da actividade destes micrococos.

Alguns estudos foram desenvolvidos no sentido de explicar o amarelecimento, que por vezes surge no bacalhau salgado.

Soudan (1955), desenvolveu um profundo trabalho sobre esta temática. De acordo com a autora, o bacalhau é mais amarelo nos peixes que ficam mais expostos ao ar, quando a escala ocorre prematuramente (antes de haver uma sangria completa), e/ou quando a lavagem é insuficiente e não remove convenientemente restos de sangue e vísceras, e/ou a qualidade e aplicação do sal não é a indicada e feita cedo demais, e/ou a temperatura a bordo ou na armazenagem é demasiado elevada. Por outro lado a autora comenta que explicar o amarelecimento uniforme exterior, revelado em alguns peixes durante a salga, como sendo resultado da rancificação das gorduras só é válido para os peixes gordos.

No mesmo estudo Soudan (1955), avança para uma explicação baseada numa reacção do tipo de Maillard, entre os aldeídos de origem lipídica e os grupos amina dos aminoácidos. Ela baseia esta hipótese no facto de muitos pesquisadores terem encontrado cadeias que ostentam uma função aldeído e um hidroxilo adjacente, que reagem como os açúcares. Os peróxidos e os aldeídos formados durante a auto oxidação das gorduras são susceptíveis de se comportar também desta forma.

Bjorkevoll *et al.*, (2003), reforçam esta hipótese. Para os autores a formação do pigmento amarelo acastanhado é resultado da reacção entre a gordura oxidada e os componentes da fracção proteica. Apesar de considerarem como um aspecto negativo esta coloração do peixe salgado, confirmam que um certo grau de rancificação é necessária e até desejável, para um nível de cura que vá ao encontro das preferências do consumidor.

A susceptibilidade da fracção lipídica à oxidação, durante a maturação do peixe, resulta do facto de os fosfolípidos das membranas musculares conterem ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa e estarem em estreito contacto com catalisadores de oxidação lipídica presentes na fase aquosa da célula muscular, como ferro e iões de cobre (Lauritzen, 2004).

No caso do bacalhau de cura amarela, o tom amarelo âmbar é uma das principais características, o que torna ainda mais importante compreender os processos que conduzem ao aparecimento desta cor, que continuam por esclarecer.

1.6. Microbiologia do bacalhau

Existem numerosos trabalhos que visam a caracterização microbiológica do bacalhau (Tabela 1.2), no sentido de conhecer a população microbiana natural do peixe, a dinâmica das populações microbianas desde a pesca, passando pela preparação, evisceração e ao longo dos diferentes processos de salga e de secagem (Boury, 1932; Tarr, 1939; Dyer, 1947; Dussault 1953; Zaleski *et al.*, 1970; Dalgaard, 1995; Skjerdal, *et al* 1997; Vilhelmsson *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2003; Bjorkevoll *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm demonstrado que os géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio* são os mais comuns no peixe do mar, estando as bactérias presentes na pele, guelras e especialmente no aparelho digestivo (Dyer, 1947; Austin, 2006).

Com temperatura da água da ordem dos 20 °C, a pele com “slime” pode apresentar valores de 10^2 a 10^7 bactérias/cm², o tecido das guelras 10^3 a 10^6 bactérias/g e o conteúdo intestinal valores de cerca de 10^3 a 10^8 heterotróficos aeróbios/ml e 10^5 anaeróbios/g (Shewan, 1961; Austin, 2006).

Os teores microbianos variam consoante a temperatura da água do mar, havendo valores superiores nas águas mais quentes. Estas variações, muitas vezes sazonais, reflectem variações do meio ambiente. A própria variação sazonal na composição do plâncton e a possibilidade de algumas espécies, que o constituem, poderem excretar substâncias antagónicas e antibióticas, também pode contribuir para estas diferenças (Shewan, 1961).

A maior parte da microbiota do peixe é aeróbia. Em estudos efectuados foram isoladas quase sempre bactérias do género *Clostridium* nas vísceras do peixe, mas nunca no “slime” da superfície. (Dyer, 1947; Dussault 1953).

De acordo com trabalho realizado por Dyer (1947), tanto em amostras de fezes como de “slime” do bacalhau fresco, o grupo isolado predominante foi o dos *Micrococcus*. No entanto é necessário referir, citando Vilhelmsson *et al.* (1997), que em estudos antigos

Tabela 1.2 – Microbiota do bacalhau fresco, salgado, salgado seco e demolido.

| Produto analisado | Microrganismos quantificados/isolados | Técnica | Autores |
|---|--|---|--|
| Bacalhau salgado | <i>Staphylococcus</i> spp. | Características culturais (meio gelatina peptonada com sal) e bioquímicas | Boury, 1932 |
| Bacalhau fresco | Gêneros: <i>Micrococcus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> ; Leveduras, | Crescimento e morfologia em meios sólidos | Tarr, 1939 |
| Bacalhau fresco | Gêneros: <i>Micrococcus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Proteus</i> , <i>Microbacterium</i> | Características culturais e bioquímicas | Dyer, 1947 |
| Bacalhau fresco, congelado | <i>Pseudomonas putrefaciens</i> | Características culturais e bioquímicas | Castell <i>et al.</i> , 1949 |
| Reima do bacalhau de cura Gaspé | Gêneros: <i>Micrococcus</i> , <i>Flavobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> ; <i>Sarcina</i> spp. | Características culturais e bioquímicas | Dussault, 1953 |
| Salmoura Cura Gaspé | Coliformes | Caract. bioquímicas | Dussault, 1962 |
| “slime” do bacalhau Bacalhau congelado | Gêneros: <i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Xanthomonas</i> | Morfologia em meios sólidos, comportamento bioquímico e método de Shewan (1960) | Zaleski, 1970 |
| Bacalhau embalado (deteriorado) | <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Vibrionaceae</i> spp., <i>Moraxella</i> spp. <i>Psychrobacter</i> spp.; Bac. Láticas | Métodos bioquímicos | Dalgaard, 1995 |
| Bacalhau fresco, salgado seco e demolido | Isolou bactérias com semelhanças com <i>Sarcina litoralis</i> , <i>Deleya salina</i> , <i>D. halófila</i> (estudo de halófilos) <i>Staphylococcus arlettae</i> , <i>S. xylosum</i> ; | Taxonomia numérica - morfologia celular e testes bioquímicos - (Isolamento em agar halófilo); Biol. Molecular | Vilhelmsson <i>et al.</i> , 1996 Vilhelmsson <i>et al.</i> , 1997 |
| Bacalhau em atmosfera modificada | Bactérias sulfitorredutoras, Bactérias lácticas e <i>Enterobacteriaceae</i> (quantificação) | Características culturais e bioquímicas | Devere e Boskou, 1996 |
| Bacalhau salgado seco e verde | <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Serratia liquefaciens</i> ; <i>Staphylococcus warieri</i> | Isolamento em PCA (15% de NaCl); meio selectivo para <i>Pseudomonas</i> ; API | Monraia, 1997 |
| Bacalhau salgado seco e demolido | <i>Psychrobacter</i> spp. | Características culturais, em meio PCA (1 e 3% de NaCl), Perfil lipídico | Bjorkevoll <i>et al.</i> , 2003 |
| Bacalhau salgado verde, salgado seco e demolido | <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Vibrio alginolyticus</i> ; <i>Pasteurella haemolytica</i> ; <i>Enterobacter</i> spp.; <i>Pseudomonas putida</i> ; <i>P. fluorescens</i> ; <i>Shewanella putrefaciens</i> ; <i>Morganella morganii</i> ; <i>Actinobacillus urea</i> ; | Características culturais em meio PCA (1% de NaCl) e bioquímicas Sistema automático Vitek | Rodrigues <i>et al.</i> , 2003 |
| Bacalhau fresco | <i>Shewanella putrefaciens</i> (quantificação) | Baseado na quantidade de sulfito de ferro produzido | Skjerdal <i>et al.</i> , 2004 |
| Bacalhau congelado | Bactérias sulfitorredutoras e <i>Photobacterium phosphoreum</i> | Método de condutância (Dalgaard <i>et al.</i> , 1996) | Esaassen <i>et al.</i> , 2004 |
| Bacalhau mantido em gelo | <i>Shewanella</i> spp. | Testes bioquímicos; Teor de G+C por HPLC e Biologia Molecular | Vogel <i>et al.</i> , 2005 |
| Bacalhau ultracongelado | Psicrótróficos e sulfitorredutores (quantificação); inferida a presença de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Photobacterium phosphoreum</i> | Características culturais e bioquímicas ; condutância (Dalgaard <i>et al.</i> , 1996) | Olafsdottir <i>et al.</i> , 2006 |
| Bacalhau demolido refrigerado | Leveduras, bolores, <i>Pseudomonas</i> [mesófilos e psicrófilos] | Características culturais e bioquímicas | Fernández-Segovia <i>et al.</i> , 2007 |

muitas vezes foram classificadas erradamente como *Micrococcus* spp. bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus*

Dyer (1947) também isolou estirpes dos géneros *Proteus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e ainda estirpes de *Microbacterium* spp. com colónias cor de laranja e redutoras de oxi-trimetilamina (OTMA).

A composição da população microbiana do peixe também está dependente da forma de captura (Botelho, 1958a; Shewan, 1961; Cahill, 1990; Esaiassen, 2004). O bacalhau capturado por arrastão apresenta maiores índices de contaminação microbiana, devido, provavelmente, ao arrastamento das redes pelo fundo dos mares, onde tocam em sedimentos muito ricos em microrganismos e, por outro lado, ao contacto entre os peixes, alguns feridos, sobretudo quando as redes são içadas para bordo (Shewan, 1962). Estas diferenças não são apenas em termos quantitativos mas também em termos de diversidade microbiana. Desta forma, relativamente à influência da temperatura, sobre a microbiota do peixe em geral, verifica-se que a percentagem de mesófilos como *Bacillus* spp. e Micrococci é superior nas águas mais quentes da Austrália, África do Sul e Adriático, e microrganismos psicrófilos, como *Pseudomonas* spp, *Achromobacter* spp. e *Flavobacterium* spp., são mais comuns em águas frias da Escócia, Canadá e costa da Noruega (Shewan, 1961).

No peixe manipulado de forma apropriada, o músculo permanece estéril até que seja contaminado, durante o descabeçamento e/ou evisceração, apesar de Shewan (1962), referir que alguns investigadores relataram a presença de bactérias no músculo.

Enquanto o peixe está vivo e saudável o próprio sistema imunitário impede que as bactérias se multipliquem no músculo. Com a morte do peixe este sistema imunitário entra em colapso e ocorre a livre multiplicação dos microrganismos (Huss, 1995).

Como acontece noutros peixes, também no bacalhau a forma e o local onde é levado a cabo o processo de lavagem, sangria e evisceração influenciam as quantidade e diversidade microbianas (Esaiassen *et al.*, 2004).

No peixe conservado em gelo, mesmo nas melhores condições, com temperaturas nunca superiores a 0 °C, o número de bactérias aumenta depois de uma fase de latência de 1 a 2 dias, atingindo valores máximos de 10^7 a 10^8 /g músculo após 9 a 10 dias. No caso do

bacalhau, depois de 10 a 12 dias no gelo fica com pouca qualidade e com 15 dias impróprio para consumo (Shewan, 1961).

No decorrer da armazenagem os microrganismos invadem a carne propagando-se entre as fibras musculares (Huss, 1995). A deterioração superficial vai-se propagando para o interior e muitas das substâncias produzidas pelo metabolismo bacteriano difundem-se para o interior podendo causar maus odores.

Wood (1940) verificou uma sucessão comum durante a deterioração do peixe. Inicialmente predominam os géneros *Micrococcus* e *Flavobacterium* seguidos por *Achromobacter* e *Pseudomonas*, já quando o peixe chega aos comerciantes.

Vários processos estão envolvidos na deterioração comum do músculo do bacalhau. O ácido láctico é oxidado e o óxido de trimetilamina (OTMA) é reduzido a trimetilamina (TMA) (Dyer, 1947). A utilização de OTMA, como aceitador de electrões, é típica de muitas bactérias de alteração. A TMA é um dos compostos dominantes no peixe alterado, associado a um odor típico. A redução de OTMA é habitualmente associada a bactérias comuns nos ambientes marinhos, como *Alteromonas* spp., *Photobacterium* spp., *Vibrio* spp., *Shewanella putrefaciens*, e bactérias intestinais – Enterobacteriaceae, (Huss, 1995). Também a *Pseudomonas putrefaciens*, altamente proteolítica, é capaz de reduzir a OTMA, ao contrário da *Pseudomonas fluorescens* (Castell *et al.*, 1949).

No bacalhau a TMA é um dos principais constituintes do azoto básico volátil total (ABVT) até à deterioração. Quando o peixe está deteriorado esgota-se a fonte de OTMA e a TMA atinge o valor máximo. Contudo, o ABVT continua a aumentar pela formação de NH₃ e outras aminas voláteis (Huss, 1995).

Os aminoácidos são substratos particularmente importantes para a formação de sulfuretos e amónia (Huss, 1995). Por exemplo, as bactérias do género *Shewanella* são capazes de degradar aminoácidos que contêm enxofre e produzir sulfuretos voláteis, incluindo H₂S (Vogel *et al.*, 2005).

Alguns dos microrganismos que se desenvolvem na carne e no peixe como *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Shewanella* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Vibrio* spp. e da família das Enterobactérias são capazes de descarboxilar aminoácidos, podendo formar aminas biogénicas. Esta actividade está associada à alteração do peixe e pode também representar um problema de segurança

alimentar (Santos, 1998; López-Caballero *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003).

Durante o processo de salga a proteólise que ocorre liberta péptidos e aminoácidos livres, como a histidina, que podem ser descarboxilados pelas enzimas microbianas. Elevadas concentrações de histamina foram determinadas em peixe salgado, anchovas, devido sobretudo à actividade de *Staphylococcus* spp.. O sal em valores de 0,5% a 10% tem um efeito estimulante na formação de amins biogénicas e só valores de 20% inibem a formação de amina pelas bactérias halotolerantes e halófilas (Hernandez-Herrero *et al.*, 1999).

As amins biogénicas putrescina e cadaverina, resultado da acção das enzimas ornitina e lisina descarboxilases respectivamente, além de indicadores de deterioração são potenciadores da acção tóxica de histamina no organismo dos consumidores, pois ao inibirem a oxidação da histamina, favorecem o transporte de histamina através das membranas celulares e a sua entrada na circulação sanguínea (Huss, 1994).

Em 1947, Dyer referia que com a alteração do bacalhau sucede a degradação das proteínas e são produzidos compostos aromáticos. Nesta fase a carne torna-se imprópria para consumo e muitas vezes a aparência do bacalhau salgado é alterada por bactérias cromogénicas, usualmente produtoras de um pigmento amarelo ou amarelo esverdeado.

No peixe salgado, apesar do efeito conservante do sal, a indústria tem de lidar com a deterioração. O efeito inibitório do sal depende das concentrações. Além disto os microrganismos têm uma elevada capacidade de adaptação. Algumas condições são adversas para um grupo mas podem ser ideais para outro. Por exemplo, as bactérias responsáveis pela degradação do peixe fresco são mesmo estimuladas por concentrações de 1% de NaCl e continuam razoavelmente activas até 6 a 8%, sendo destruídas a concentrações superiores. Outro grupo de bactérias, o das formadoras de reima, multiplica-se a concentrações de 6-12% de sal (Klaveren e Legendre, 1965).

Mesmo utilizando valores mais elevados de sal, não se consegue erradicar os problemas de origem microbiana, dado que existem bactérias halófilas que se desenvolvem a 13% de sal. Este grupo de halófilas vermelhas, responsáveis pelo “rouge” (coloração vermelha no peixe), são temidas comercialmente, pois conferem ao peixe um odor repulsivo (Klaveren e Legendre, 1965).

A deterioração caracterizada pela coloração vermelha do bacalhau salgado é devido à multiplicação de bactérias halófilas. Existem dois grupos distintos: *Sarcina littoralis* e *Pseudomonas salinaria*. Ambos são proteolíticos e *Pseudomonas salinaria* é responsável pelo cheiro desagradável emanado pelo peixe salgado contaminado. Os compostos de decomposição são indol e H₂S, sendo este último produzido graças à enzima cisteína dissulfidrase que requer 25-30% de NaCl (Baxter e Gibbons, 1957, cit in Klaveren e Legendre, 1965).

Estas bactérias são consideradas termófilas e são mais resistentes aos raios ultravioletas do que outras bactérias, podendo adaptar-se facilmente a diferentes condições do meio. São aconselhadas temperaturas baixas ao longo de todo o processo e a lavagem dos espaços, paredes, tanques, chão e equipamento com água não salgada, dado que este tipo de bactérias necessita tanto de NaCl, que ocorre a lise celular na sua ausência (Klaveren e Legendre, 1965).

Estas bactérias são veiculadas pelo sal onde podem ser destruídas com a utilização de ozono, desde que a humidade relativa seja de 80%, e a sua multiplicação fica comprometida em meios de 2-4% de metabissulfito de sódio (Freixo, 1956).

Estes factos justificam muitos dos cuidados a ter no processamento do bacalhau, particularmente a manutenção do peixe a baixas temperaturas nas fases iniciais do processo de salga.

A reima é uma substância que se forma à superfície, viscosa, semi-oleosa, pegajosa, brilhante e amarelada, com um aroma forte e penetrante, que ocorre geralmente no bacalhau de cura Gaspé (amarela), durante as fases de compressão e nas fases iniciais de secagem (Klaveren e Legendre, 1965).

Substância similar é descrita em certos queijos, sendo associada ao desenvolvimento das suas propriedades sensoriais características (Reps, 1999).

De acordo com Reps (1999), os principais factores que afectam esta reima, dos queijos, prendem-se com a composição microbiana (que dependente da composição da microbiota do ambiente de processamento), interacções entre os diferentes grupos microbianos, actividade da água, teor de sal à superfície, humidade e temperatura ambiente.

Assim, no início do período de cura, os microrganismos que se desenvolvem são os que toleram a acidez e concentrações elevadas de sal, como é o caso das leveduras. Quando

o pH sobe, reúnem-se condições para a multiplicação de outros grupos microbianos (Reps, 1999).

As bactérias com papel relevante na formação da reima no decurso da cura dos queijos são sobretudo dos géneros *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Brevibacterium* (Denis e Irlinger, 2007), *Pseudomonas*, *Aerobacter* e *Alcaligenes* (Davis e Babel, 1953).

Estirpes do género *Micrococcus* isoladas a partir da reima superficial do queijo Cheddar demonstraram elevada actividade proteolítica e lipolítica, sendo que a proteólise é máxima a pH 5.5. a 22 °C. O género *Arthrobacter* e *Brevibacterium* toleram elevadas concentrações de NaCl, sendo que, este último género bacteriano é decisivo para a cor da reima (Reps, 1999). Alguns destes géneros bacterianos foram descritos, por diversos autores, no bacalhau (Tabela 1.2).

Em relação ao bacalhau de cura Gaspé, segundo observações relatadas por Dussault, (1953), depois da secagem esta camada apresenta a forma de um pó seco amarelo e, nos casos em que a formação de reima é extrema, abrem-se fendas na carne, onde a substância húmida pegajosa permanece. O autor aponta a salga inadequada e/ou longos períodos de compressão como principais razões para a formação de reima. Também a frescura do peixe, condições ambientais de temperatura e humidade elevadas e circulação de ar inadequada, são factores favoráveis ao desenvolvimento microbiano e aparecimento da reima.

Dussault (1953) realizou um estudo de quantificação e caracterização da microbiota associada à reima no bacalhau levemente salgado (de cura Gaspé). Apesar do tipo de amostragem efectuada e das normais variações entre os peixes analisados, verificou que a contagem bacteriana só apresentava um aumento significativo a partir do momento em que se detectava o aparecimento da reima. Por este motivo, segundo o autor, aparentemente só um reduzido número de espécies bacterianas, com as condições favoráveis de concentração de sal, humidade e temperatura são responsáveis por este tipo de alteração.

A presença de bolores da espécie *Sporendonema epizoum* é comum e responsável por uma alteração que se denomina «empoado» e que corresponde visualmente a uma camada castanho acinzentado que reveste o bacalhau. Este fungo halófilo desenvolve-se

muito bem a temperatura de 25 °C, humidade relativa de 75% e numa concentração de sal de 10-15% (Klaveren e Legendre, 1965).

Quando o bacalhau salgado verde ou seco é demolido, para ultracongelação e/ou posterior consumo, criam-se condições que favorecem a multiplicação de espécies microbianas que podem causar alterações.

Como afirmam Pedro *et al.* (2002), a demolha deve ser levada a cabo a baixas temperaturas, de forma a evitar a contaminação ou recuperação de estirpes microbianas capazes de produzir maus odores e substâncias de alteração, prolongando assim, a vida útil do produto.

Após a reidratação as condições tornam-se mais favoráveis ao desenvolvimento microbiano devido ao aumento do teor de água (cerca de 70%) e à baixa concentração de sal (2 - 4% de NaCl). Mesmo que a demolha seja efectuada a 4 °C, com água e equipamento estéril, o bacalhau tem uma vida útil curta (Bjorkevoll *et al.*, 2003).

Parte da microbiota responsável pela alteração do peixe demolido, não resulta de uma contaminação durante o processo, já estando presente no peixe fresco. Por exemplo, estirpes do género *Psychrobacter* foram isoladas na pele de bacalhau recém-capturado e verificou-se que este género bacteriano também predomina no bacalhau demolido, sendo que, ao tolerar concentrações acima de 25% de NaCl, é capaz de sobreviver durante o processo de salga (Bjorkevoll *et al.*, 2003).

A multiplicação de microrganismos halotolerantes, ou moderadamente halófilos, psicrotróficos, sobreviventes à salga e secagem, é fomentada pela demolha em condições de refrigeração. Nestas condições de temperatura predominam os géneros *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Shewanella* spp. (Frazier e Westhoff, 1988).

Rodrigues *et al.* (2003), confirmaram estes resultados, ao isolarem 3 estirpes de *Pseudomonas putida*, 34 de *Pseudomonas fluorescens* e 7 de *Shewanella putrefaciens* num total de 70 estirpes Gram⁻, a partir de bacalhau demolido. No entanto, no mesmo estudo e produto, os autores identificaram 22 estirpes, de 24 estirpes Gram⁺ isoladas, como pertencentes ao género *Staphylococcus* (11 estirpes de *S. warneri*, 1 estirpe de *S. hominis*, 5 de *S. epidermis*, 1 de *S. haemolyticus*, 3 de *S. simulans* e 1 de *S. saprophyticus*)

1.6.1. Métodos de análise microbiológica

Os primeiros trabalhos realizados na área da microbiologia do bacalhau assentavam exclusivamente em métodos clássicos, caracterizados pela contagem e observação de colónias em meios sólidos, subsequente purificação das culturas, observação e caracterização microscópica das células, coloração de Gram e alguns testes bioquímicos (Boury, 1932; Boury, 1934; Tarr, 1939; Dyer, 1947; Castell *et al.*, 1949; Dussault, 1953; Zaleski *et al.*, 1970).

Muitos dos meios de cultura utilizados inicialmente, baseavam-se num meio de gelatina peptonada com adição de sal, ou caldo de peixe (por vezes especificamente bacalhau), gelosado saturado em sal, para determinação dos halófilos (Boury, 1932), ou ainda uma mistura de caldo de peixe e farinha de arroz (Boury, 1934).

Apesar do desenvolvimento de diversos meios de cultura, mais ou menos selectivos, e de formas mais simples e/ou sofisticadas de apresentação dos meios sólidos (*Redigel* - RCR Scientific; *Petrifilm*TM SM - 3M Company) o teor microbiano, com base na contagem de colónias, é subestimado, pelo facto de uma grande parte dos microrganismos não ser cultivável (Austin, 2006). Outra desvantagem apontada, tem a ver com o tempo prolongado de incubação (Huss, 1995).

De acordo com Austin (2006), as técnicas microscópicas têm tido uma aplicação crescente na quantificação da microbiota do peixe, assim como a técnica automatizada de epifluorescência directa – DEFT (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 – Métodos utilizados para a estimativa da carga microbiana em peixe (adaptado de Huss, 1995).

| Método | Temperatura °C | Tempo Incubação | Sensibilidade, UFC/g |
|--|-------------------|--------------------|----------------------------------|
| Contagem de colónias em PCA ou IA* | 15-25 | 3-5 dias | 10 |
| "Redigel"/"Petrifilm TM SM" | 15-25 | 3-5 dias | 10 |
| Microcolonia-DEFT | 15-30 | 3-4 horas | 10 ⁴ -10 ⁵ |
| DEFT | - | 30 min. | 10 ⁴ -10 ⁵ |
| ATPmetria | - | 1 hora | 10 ⁴ -10 ⁵ |
| Teste do lisado de <i>Limulus</i> | - | 2-3 horas | 10 ³ -10 ⁴ |
| Microcalorimetria/Redução de corantes | 15-25 | 4-40 horas | 10 |

*PCA – Meio Plate Count Agar; IA- Meio Iron Agar

O exame microscópico de peixe, é uma forma rápida de estimar os índices bacterianos. Uma célula por campo de visão equivale aproximadamente a 5×10^5 UFC/mL a uma ampliação de 1000 x. A coloração de células com laranja de acridina e detecção por microscopia de fluorescência ganhou grande aceitação, como a técnica de microscopia de epifluorescência directa (DEFT). Embora os métodos microscópicos sejam muito rápidos, apresentam a desvantagem da baixa sensibilidade (Huss, 1995).

Diversos métodos como a microcalorimetria, a redução de corantes e condutância, utilizados para a estimativa rápida dos números bacterianos são baseados na colheita de uma amostra, incubação a temperatura de 20 - 25 °C e detecção de um determinado sinal. Na microcalorimetria o calor gerado pela amostra é comparado com um controlo estéril. Na condutância são medidos as variações das propriedades eléctricas da amostra e comparadas com um controlo estéril (Huss, 1995).

Um grupo de trabalho liderado por Gram e Søggaard (1985), estudou a potencialidade da microcalorimetria para monitorizar a qualidade microbiológica de bacalhau. Verificaram uma correlação significativa entre os máximos da taxa de produção de calor exotérmico e a contagem de colónias. O que permite que um teor bacteriano entre 10^4 e 10^8 possa ser estimado em menos de 24 horas.

A medição da quantidade de adenosina trifosfato bacteriana (ATPmetria) ou da quantidade de endotoxina (bactérias Gram-negativas) pelo lisado de *Limulus* (LAL) também permitem estimar o teor microbiano do peixe nomeadamente bacalhau (Tabela 1.3). O primeiro é muito rápido, mas existem dificuldades intransponíveis em separar ATP bacteriano e do ATP somático (Huss, 1995).

Na quantificação e/ou pesquisa de espécies relevantes para a avaliação da qualidade do bacalhau, também tem havido um esforço para desenvolver metodologias eficientes e fiáveis.

Diferentes substratos ricos em peptona, contendo citrato férrico têm sido utilizados para a detecção de bactérias produtoras de H_2S , tais como *Shewanella putrefaciens*, que podem ser vistas como colónias pretas devido à precipitação de FeS (Huss, 1995). Um método rápido e sensível para a quantificação de bactérias sulfito-redutoras foi desenvolvido por Skjerdal *et al.*, (2004). Este baseia-se na taxa de formação de sulfureto de ferro durante o crescimento de bactérias sulfitorredutoras num meio contendo

cisteína, tiosulfato de sódio e citrato de ferro. O sulfureto de ferro torna o meio cinzento, mascarando o fundo fluorescente do meio quando o teor de bactérias sulfito redutoras atinge aproximadamente 10^9 ufc/ml. Esta mudança da fluorescência pode ser detectada instrumentalmente.

Tendo em conta a elevada toxicidade da histamina, foi desenvolvido por Niven *et al.* (1981), um meio de cultura diferencial, que permite a detecção quantitativa de bactérias responsáveis pela sua produção. Um meio que se caracteriza por ter na sua composição L-histidina e bromocresol púrpura. As colónias de bactérias capazes de descarboxilar a histidina evidenciam um halo púrpura característico neste meio, o que permite fazer de forma simples uma quantificação deste grupo de microrganismos, em amostras de peixe. A alteração de origem ambiental é geralmente causada por membros de Vibrionaceae que também irão formar colónias pretas no agar de ferro, no qual uma fonte de enxofre orgânico é adicionada (por exemplo, agar de ferro, Lyngby).

Em alguns estudos de caracterização dos microrganismos do bacalhau, recorreu-se a ferramentas expeditas de caracterização fenotípica, nomeadamente as galerias de identificação miniaturizadas API, Vitek GNI+, NFC, GPI cards, BIOLOG (Monraia, 1997; Pedro *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003; Austin, 2006). Estas ferramentas permitem abreviar o processo de caracterização bioquímica/enzimática, mas a sua utilização nem sempre é adequada ao tipo de amostra analisada nem permite, na maioria das vezes, identificações correctas.

No estudo preconizado por Rodrigues *et al.*, (2003), de um total de 179 estipes isoladas, cerca de 13%, sobretudo oriundas de amostras de bacalhau salgado verde e bacalhau salgado seco, não foram identificadas. Os autores justificam esta dificuldade com a possibilidade do equipamento Vitek não ser adequado para identificar espécies, que se adaptam aos meios com elevada concentração de sal.

Os métodos mais recentemente usados são sobretudo baseados na biologia molecular como é referido por Vogel *et al.*, (2005). Estes métodos apresentam a vantagem de poderem ser aplicados a microbiota não cultivável.

*“O nevoeiro denso rolava no convés molhado do lugre,
esfumava os mastros e as silhuetas dos homens,
que engoliam a ceia à pressa e vinham armar as mesas para a escala do peixe.”*

Anselmo Vieira,
Nos Mares da Terra Nova - A Saga dos Bacalhoeiros, 2010

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria-prima

O bacalhau, de diferentes categorias, usado no presente estudo, proveio da Islândia e foi fornecido por duas empresas do sector (denominadas **R** e **L**), localizadas nas regiões de Lisboa e Coimbra, respectivamente.

2.2. Delineamento experimental

O conjunto de ensaios efectuados e a interligação entre eles encontra-se esquematizado na Figura 2.1.

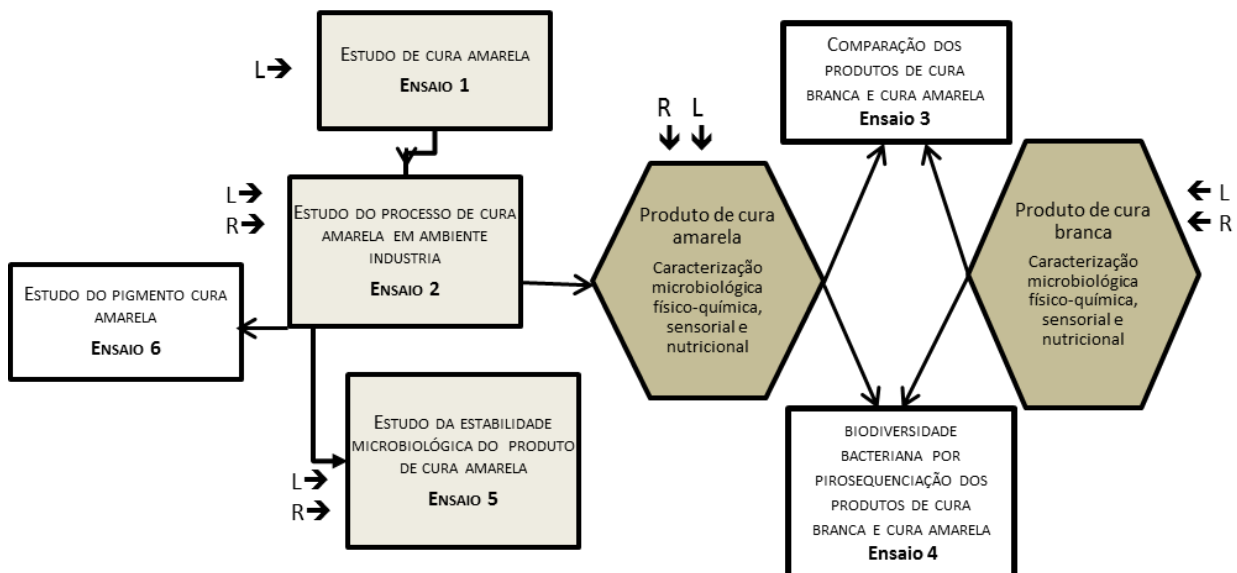


Figura 2.1 - Esquema da organização do trabalho experimental realizado (L, R: empresas fornecedoras dos peixes analisados nos ensaios).

2.2.1. Estudo de cura amarela - Ensaio 1

Neste ensaio prévio estudou-se em laboratório o processo de cura amarela do bacalhau, tendo como objectivo reproduzir as condições de humidade e temperatura características dos locais em que esta cura amarela era efectuada de modo artesanal. Nestes locais o peixe era deixado durante vários meses a secar ao sol, provavelmente em áreas junto à costa com humidade relativa elevada e temperatura inferior a 24 °C.

Neste estudo fez-se variar o teor de humidade do local de cura para ver até que ponto era controlável o desenvolvimento de um muco superficial que no presente estudo é designado reima.

Assim, efectuaram-se duas experiências, utilizando em cada uma dois peixes cortados em pedaços rectangulares de 10 por 20 cm, aproximadamente. Quer numa, quer noutra experiência realizou-se uma única demolha, a temperatura ambiente controlada (15 °C), durante 20 h, com água fria da rede, não esterilizada, simulando em laboratório as condições de processamento da empresa L. A maturação foi efectuada à temperatura ambiente de 20 °C, numa câmara de temperatura e humidade controlada (Figura 2.2).



Figura 2.2 – Pedaços de bacalhau numa câmara de temperatura e humidade controladas, durante a fase de maturação a uma humidade ambiente de 75%. O círculo branco indica a reima que se formou.

Numa das experiências, a humidade do ambiente de maturação foi regulada para 70%, mantendo-se neste valor até ao final, ou seja, durante 15 dias (Figura 2.3), tendo-se efectuado análises na fase de bacalhau salgado verde, pós-demolha e ao fim de 8 e 15 dias, de maturação.

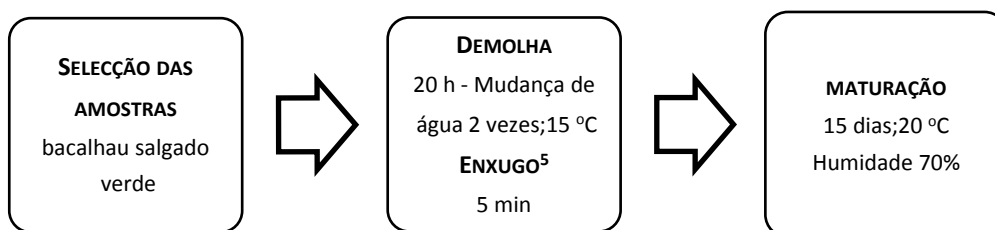


Figura 2.3 - Diagrama de preparação laboratorial do bacalhau de cura amarela com humidade de maturação de 70%. (Enxugo⁵ termo usado na indústria no sentido de escorrimento).

⁵ Enxugo: termo usado por Botelho (1953b; Castro, 1946)

Na outra experiência, a maturação foi iniciada num ambiente de 75% de humidade e, quando se iniciou a formação de reima, foi reduzida para 70% durante 7 dias, com o intuito de controlar a formação de reima (Figura 2.4). Efectuaram-se análises na fase de peixe salgado verde, pós-demolha, quando se observou a formação de reima (que ocorreu ao fim de 8 dias), e ao fim de 15 dias, depois da diminuição da humidade para 70%.

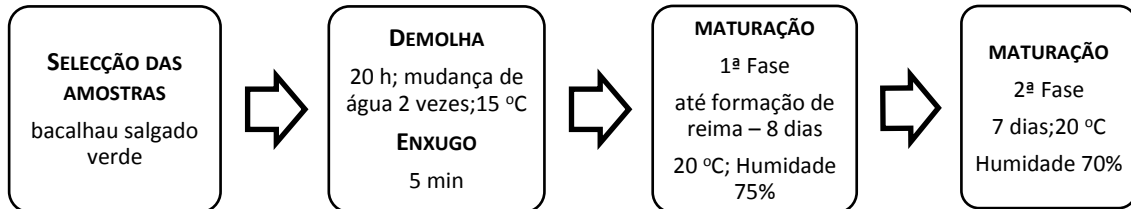


Figura 2.4 - Diagrama do estudo laboratorial do bacalhau de cura amarela com humidade de maturação de 75% e depois de 70%.

Em ambas as experiências e em cada uma das fases, foram avaliadas as características microbiológicas (presença e evolução quantitativa dos grupos funcionais de bactérias ao longo do processo) e físico-químicas (pH, a_w , humidade e cloretos). Observou-se e registou-se diariamente as alterações de cor, bem como outras alterações do aspecto incluindo a ocorrência de reima.

Nas análises referidas aplicaram-se as metodologias que se encontram descritas em 2.3.

2.2.2. Evolução da população microbiana e dos parâmetros físico-químicas ao longo do processo de cura amarela em ambiente industrial - Ensaio 2

Este estudo visou compreender o processo de preparação do bacalhau de cura amarela em ambiente industrial, avaliando-se o comportamento dos diferentes grupos funcionais de bactérias e de indicadores físico-químicos ao longo do processo.

As metodologias seguidas em cada uma das empresas, até à obtenção do produto final apresentaram algumas diferenças como se ilustra na Figura 2.5.

O processo foi iniciado em simultâneo para todos os peixes analisados neste estudo, tendo sido colhidos 3 peixes em cada uma das fases de preparação. No caso da empresa **R** estas fases foram: 1) salgado verde, 2) pós primeira demolha, 3) pós primeira secagem, 4) pós segunda demolha e 5) produto final obtido no início da armazenagem, perfazendo um total de 15 peixes.

No caso da empresa **L** as amostras foram colhidas nas fases: 1) salgado verde, 2) pós primeira demolha e 3) produto final obtido no início da armazenagem, perfazendo um total de 9 peixes.

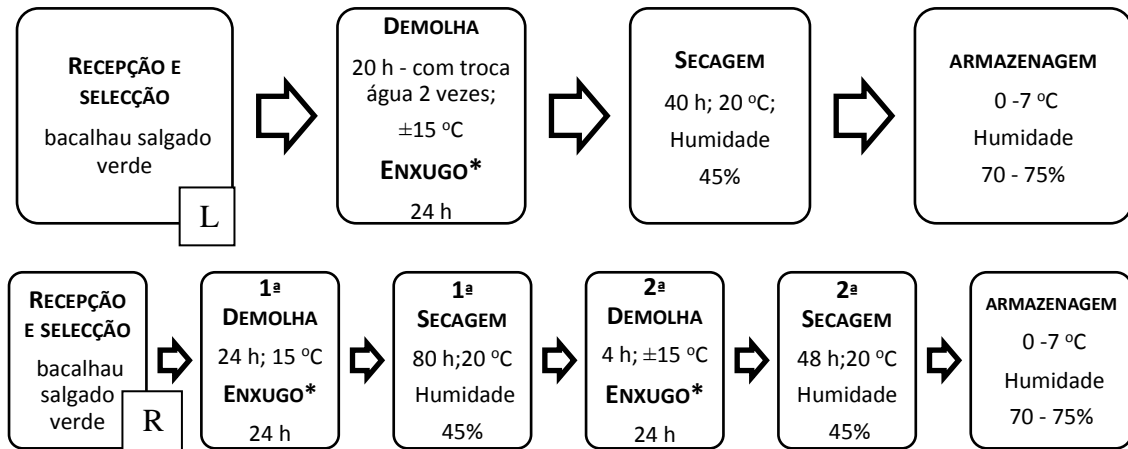


Figura 2.5 - Diagrama dos processos de preparação do bacalhau de cura amarela seguidos nas empresas R e L. (*enxugo com empilhamento)

Os 15 peixes provenientes da empresa **R** apresentaram uma massa unitária entre 4 e 5 kg, e os 9, da empresa **L**, entre 1,2 e 1,7 kg. Considerou-se como produto final o peixe que apresentava cor amarela âmbar, aspecto seco, resistente ao toque e pouco flexível. No bacalhau da empresa **L** estas características foram obtidas logo no final da secagem dos peixes, pelo que, neste caso, as análises, quer microbiológicas quer físico-químicas, terminaram nesta fase.

Em termos de avaliação microbiológica estudou-se a evolução quantitativa dos seguintes grupos funcionais de bactérias ao longo do processo: mesófilas aeróbias totais, sulfitorredutoras, proteolíticas, amonificantes e produtoras de histamina.

No que respeita aos parâmetros físico-químicos, foram determinados os seguintes: humidade, cloretos, azoto básico volátil (ABVT) e azoto de trimetilamina (N-TMA).

As metodologias analíticas utilizadas encontram-se descritas em 2.3.

2.2.3. Comparação entre o bacalhau de cura amarela e o bacalhau de cura branca - Ensaio 3

Com este estudo pretendeu-se apurar as diferenças microbiológicas, físico-químicas, nutricionais e sensoriais, entre o bacalhau de cura branca tradicional (salgado seco) e bacalhau de cura amarela, na fase de comercialização.

Procurou-se ainda averiguar a existência de diferenças entre o produto final da cura amarela obtido ao fim de 3 semanas e o produto final da cura amarela com uma maturação prolongada até 3 meses. Segundo alguns especialistas do sector (Vaz Guedes, 2009, comunicação pessoal), o prolongamento da maturação favorece o desenvolvimento do sabor e aroma característicos.

Os peixes utilizados nesta comparação apresentavam massa inicial semelhante entre 4 e 5 kg e estavam classificados como “bacalhau especial”.

O processo foi iniciado em simultâneo para todos os peixes. Cada empresa forneceu 6 exemplares, perfazendo um total de 12. Destes, quatro exemplares foram sujeitos ao processo de preparação do salgado seco, também designado neste trabalho como cura branca (Figura 2.6), e os restantes oito foram submetidos ao processo de cura amarela (Figura 2.7). Deste último grupo (cura amarela), quatro peixes foram retirados e analisados findo o processo de 3ª secagem, ou seja, ao fim de cerca de 2 semanas. Os restantes foram sujeitos a um prolongamento da maturação por um período de 3 meses, em condições de temperatura de 7 ± 2 °C, e avaliados no final desse período de tempo.

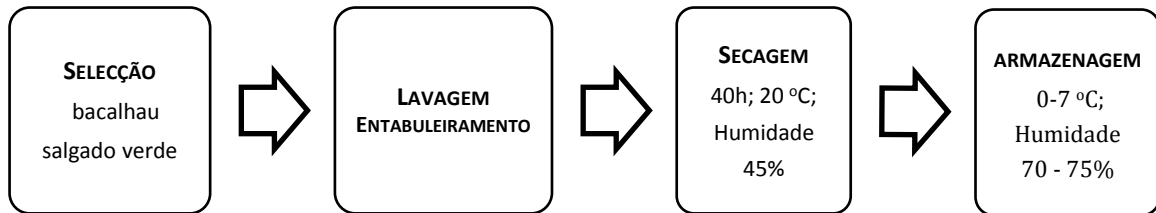


Figura 2.6 - Diagrama da preparação do bacalhau de cura branca pelas empresas L e R.

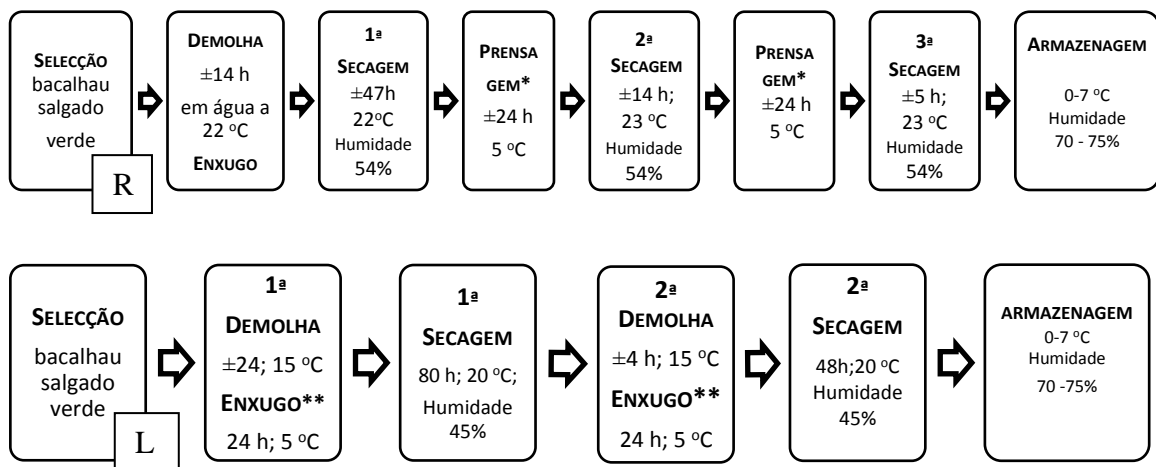


Figura 2.7 - Diagramas da preparação do bacalhau de cura amarela pela empresa R e L (* prensagem 170 kg/m²; ** com empilhamento)

Os processos de cura amarela da empresa **R** e **L** incluíram uma fase de prensagem. No caso da empresa R foi possível quantificar (170 kg/m^2). Na empresa L a prensagem foi exercida na fase de enxugo, pelo empilhamento do peixe.

Cada um dos peixes de cura branca e cura amarela, cujo aspecto típico é ilustrado na Figura 2.8, foi cortado longitudinalmente em duas partes.



Figura 2.8 – Aspecto típico de um bacalhau de cura branca (a) e de um bacalhau de cura amarela (b).

Para as análises microbiológicas colheram-se assepticamente pequenas porções de uma das metades de cada peixe. Essa mesma metade do peixe foi posteriormente cortada em tiras uniformes com cerca de 5 cm de largura. Porções provenientes da zona com maior espessura (vulgarmente designada como lombo), foram utilizadas para a avaliação sensorial em cozido (Figura 2.9).

A outra metade foi utilizada inicialmente inteira, para análise sensorial em cru e, posteriormente, também foi cortada em tiras de cerca de 5 cm de largura. Uma parte foi utilizada para as análises físico-químicas e nutricionais em cru⁶ (humidade, cloretos, ABVT, N-TMA, proteína, gordura e cinza) e a restante foi demolhada, em água fria, à temperatura de 5 °C, durante 48 h, com mudança de água de 8 em 8 h, para a avaliação nutricional em demolhado (humidade, proteína, gordura e minerais – Na, K, Ca). Quer num caso, quer no outro, as porções foram totalmente cortadas, trituradas e homogeneizadas, excluindo apenas a espinha dorsal, pelo facto de danificar a máquina de trituração.

⁶ Bacalhau cru: bacalhau seco não demolhado e não confeccionado.

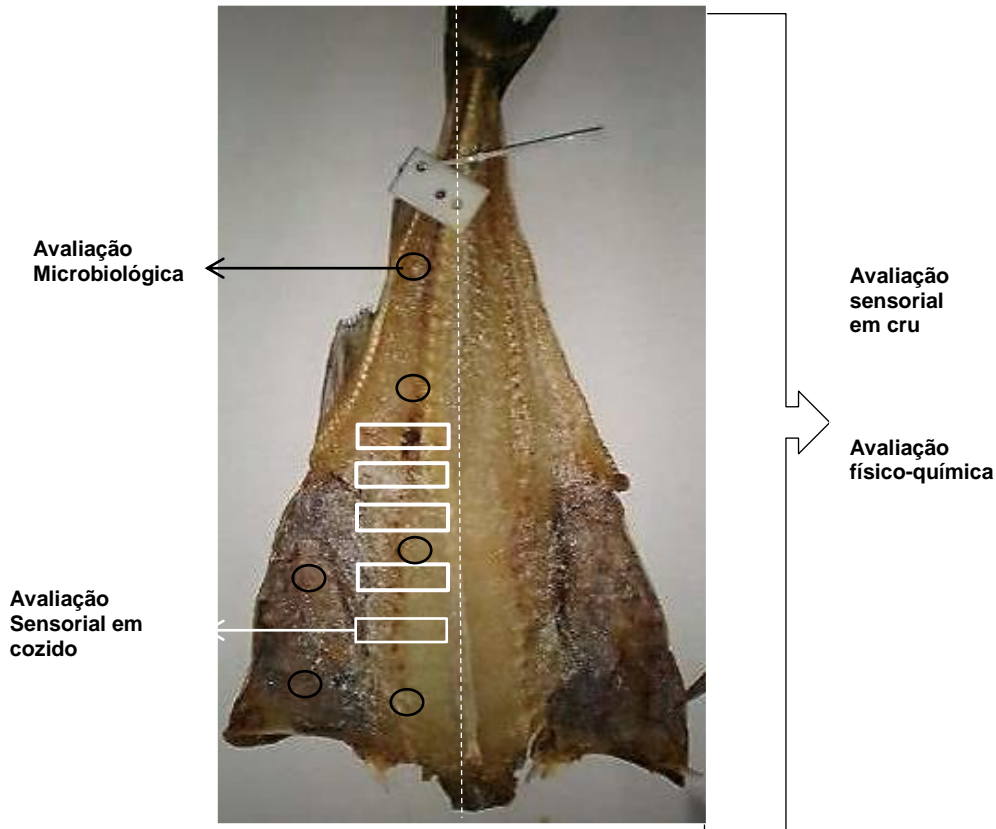


Figura 2.9 - Esquema da preparação das amostras de bacalhau, para as diferentes análises.

Na rubrica 2.3. encontram-se indicadas e descritas as metodologias utilizadas nestas análises.

2.2.4. Estudo da biodiversidade microbiana do bacalhau de cura branca e de cura amarela com base no método de sequenciação múltipla paralela de DNA - Ensaio 4

Este estudo foi realizado na sequência do ensaio 3 (rubrica 2.2.3.), em colaboração com a BIOCANT Portugal, onde foi realizada a extracção do DNA microbiano total existente nas amostras e o subsequente método de sequenciação múltipla paralela de DNA (pirosequenciação).

O objectivo foi comparar a biodiversidade microbiana no bacalhau de cura branca e de cura amarela, com e sem prolongamento de maturação (3 semanas e 3 meses, respectivamente).

A partir das amostras compostas, colhidas para as análises microbiológicas descritas no ensaio 3, retiraram-se porções de 10 g que foram diluídas com água peptonada 1:10. As

amostras foram homogeneizadas por 2-3 min no homogeneizador Stomacher[®] 400 (Seward, UK). O homogeneizado foi dividido em tubos Falcon de 50 mL, diluído 1:2 com água peptonada. Centrifugou-se durante 2 min a 700 rpm. O sobrenadante foi recolhido para novos tubos e o procedimento foi repetido. Os sobrenadantes foram misturados e centrifugados durante 15 min, a 15000 rpm (Beckman Avanti J-26 XPI, rotor JA25.50). O sobrenadante foi eliminado e o “*pelet*” (sedimento) ressuspenso em 5 mL de TE (10 mM Tris-Cl; pH 7,5; 1 mM EDTA) e centrifugado durante 10 min a 9000 rpm. O sobrenadante foi novamente eliminado e o sedimento total ressuspenso em 5 mL de TE e centrifugado posteriormente numa microcentrífuga para concentrar o “sedimento” bacteriano.

O DNA foi isolado com o “kit” DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valência), de acordo com as instruções do fabricante para o isolamento de DNA bacteriano.

Procedeu-se à amplificação da região hipervariável V3V4 do RNA ribossomal 16S a partir das três amostras. Utilizou-se o “primer” directo 5'ACTCCTACGGGAGGCAG-3' e o “primer” reverso 5'-TACNVRRGTHCTAATYC-3'.

O produto de PCR resultante foi purificado e visualizado num sistema de electroforese capilar automatizado (Caliper Life Sciences), e quantificado por fluorescência recorrendo ao “kit” Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante e misturado em quantidades equimolares. O produto resultante da amplificação foi imobilizado em esferas, numa proporção que garantiu que apenas uma molécula de DNA se ligasse por esfera e fosse amplificada de forma clonal. O PCR de emulsão foi realizado seguindo as instruções do fabricante (454 LifeSciences, Roche, Branford, Connecticut, USA).

Finalmente procedeu-se à sequenciação das amostras a partir do adaptador A no pirosequenciador Genome Sequencer FLX (454 LifeSciences, Roche, Branford, Connecticut, USA) do Biocant (Cantanhede, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante.

A colecção de “esferas” de DNA resultante foi introduzida em poços de um dispositivo de PicoTiterPlate (PTP). Uma vez no sequenciador Genome Sequencer FLX Instrument (Roche-454 Life Sciences) o sistema de fluidos distribui os reagentes de sequenciação (contendo tampões e nucleótidos) pelos alvéolos da placa. Os quatro nucleótidos de DNA foram adicionados sequencialmente segundo uma ordem estabelecida. Durante o fluxo de nucleótidos, milhões de cópias de DNA ligado a cada uma das esferas foram

sequenciadas em paralelo. Quando um nucleótido complementar à cadeia molde foi adicionado num poço, a polimerase estendeu a molécula de DNA existente adicionando nucleótido(s). A adição de um (ou mais) nucleótido(s) gerou um sinal de luz que foi gravado pela câmara CCD (“ charge-coupled device” - dispositivo de carga acoplada), no aparelho. A intensidade do sinal foi proporcional à quantidade de nucleótidos. Um “Software” apropriado converteu os sinais luminosos numa informação lida pelo sequenciador final, gerando a sequenciação final.

As sequências provenientes do sequenciador foram afinadas com o objectivo de apresentarem alta qualidade. Esta afinação foi realizada primeiro ao nível do sequenciador, utilizando os parâmetros internos do “software” e, em seguida, através da remoção de amostras com menos de 100 bp, que apresentaram bases (N) indeterminadas. A totalidade de cada sequência é afinada por forma a reter apenas bases de alta qualidade. As sequências de elevada qualidade foram então agrupadas, de acordo com as suas semelhanças, gerando sequências consenso que diferem em 3%, denominadas UTO (“Operational Taxonomic Units” - Unidades Taxonómicas Operacionais).

A identificação taxonómica de cada UTO foi realizada por pesquisas BLAST comparando com sequências presentes em bancos de dados públicos, como o GeneBank.

2.2.5. Estudo da estabilidade microbiológica do bacalhau de cura amarela - Ensaio 5

Este ensaio teve como objectivo determinar os marcadores microbiológicos, físico-químicos e sensoriais associados ao produto estável e ao produto deteriorado microbiologicamente, sujeitando a maturação do bacalhau amarelo a condições de temperatura e humidade variáveis.

Cada empresa (**R** e **L**) forneceu 14 peixes, todos da categoria “bacalhau especial”, perfazendo um total de 28 amostras.

O processo foi iniciado em simultâneo com todos os peixes (Figura 2.10), tendo sido retirados para análise quatro exemplares em cada uma das 7 fases avaliadas: salgado verde, demolha, após 1ª secagem, 2ª secagem, 3ª secagem (correspondendo ao produto com qualidade comercial), início de putrefacção e produto putrefacto.

O início da putrefacção foi atingido ao fim de 45 dias de maturação a 15 °C e a 67% de humidade (valores médios pois os locais de armazenamento não tinham temperatura nem humidade controladas, podendo variar em função da hora do dia e actividades desenvolvidas) quando se observaram sinais de deterioração, nomeadamente formação de reima superficial e um cheiro desagradável.

O peixe foi considerado em putrefacção após 1 mês e meio quando o cheiro e o aspecto se tornaram repulsivos, com formação exuberante de reima. No caso dos peixes maturados na empresa **R** ocorreu desenvolvimento superficial de bolores (aspecto empoado).

Neste contexto importa salientar que o estado considerado de putrefacção no presente estudo, à luz do conceito patente na bibliografia (ICMSF, 1988), não corresponde, em rigor, a putrefacção, pois este conceito pressupõe a perda de integridade e a decomposição com cargas microbiana mais elevadas ($> 10^8$).

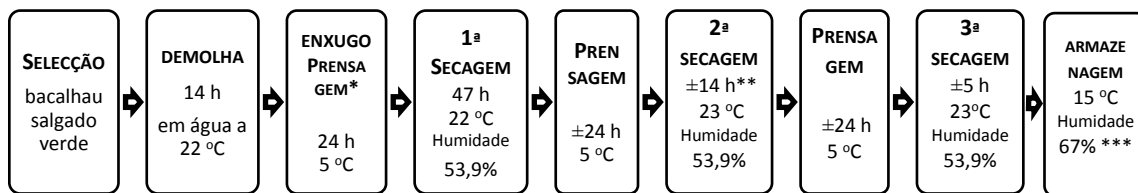


Figura 2.10 - Diagrama do processo de preparação dos peixes de cura amarela do ensaio 5 (*na empresa **R** prensagem com 170 kg/m²; ** na empresa **L** o tempo de 1ªsecagem foi de ±39 h e o da 2ª secagem de 19h; ***no local de armazenagem da empresa **R** a humidade variou em função da hora do dia e das actividades desenvolvidas; valor mínimo 63% e máximo 83%).

Cada peixe foi dividido ao meio longitudinalmente e efectuou-se a colheita e preparação das amostras para as análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais como descrito anteriormente (ver Figura 2.11).

A avaliação microbiológica incidiu na evolução quantitativa dos grupos funcionais ao longo do processo (bactérias aeróbias totais, bactérias sulfito redutoras, proteolíticas, amonificantes, produtoras de histamina, descarboxilantes de arginina, de lisina e ornitina). A análise físico-química incidiu na humidade, cloretos, ABVT, N-TMA e azoto dos aminoácidos livres. A metodologia está indicada na rubrica 2.3. e descrita com maior detalhe no Anexo I.

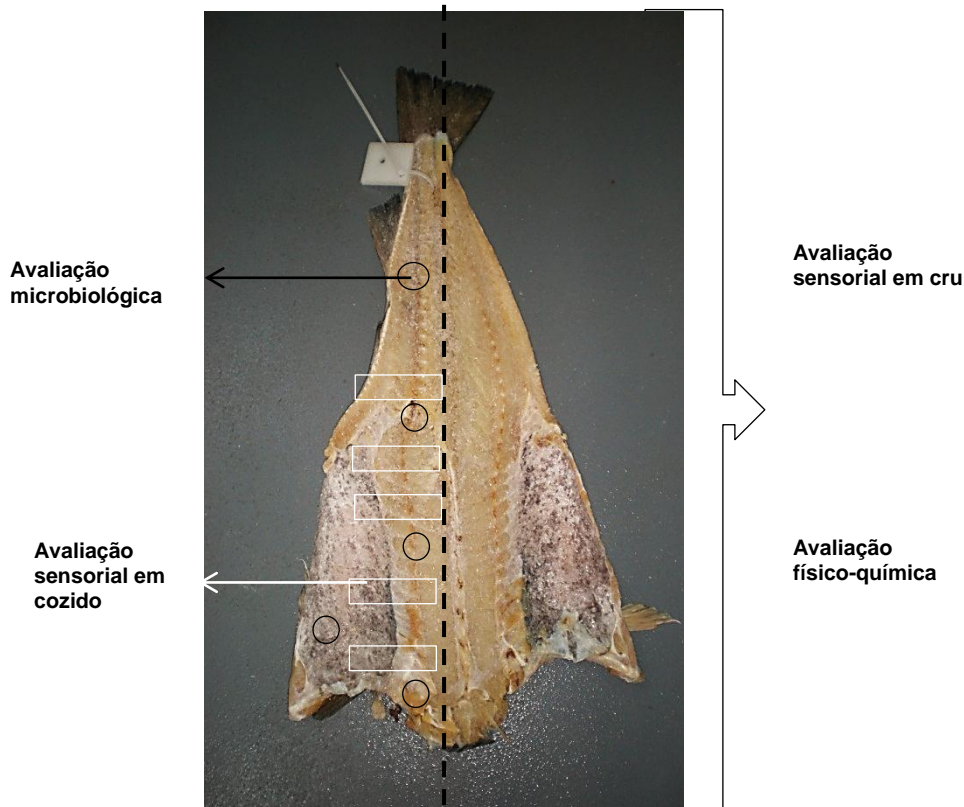


Figura 2.11 - Esquema de utilização de cada peixe para as diferentes análises.

2.2.6. Purificação e caracterização química do pigmento presente no bacalhau de cura amarela - Ensaio 6

Com este estudo pretendeu-se caracterizar do ponto de vista químico o pigmento amarelo do bacalhau de cura amarela, no sentido de avaliar se a sua génese estaria relacionada com actividade microbiana.

Foram utilizadas duas amostras de bacalhau de cura amarela com a mesma origem. Uma proveniente da fase da segunda secagem (codificada como **L4**) e a outra de produto final (codificada **L5**).

Pesaram-se 100 g de cada amostra previamente triturada e homogeneizada (Figura 2.12) para balões de Erlenmeyer e cada uma delas foi sujeita ao tratamento descrito em seguida e adaptado de Patil *et al.*, (2009).

Misturou-se com 300 mL de metanol e sujeitou-se a agitação durante 2 h, num agitador magnético. Após este período filtrou-se o sobrenadante através de um filtro de Buchner de porcelana, de 70 mm de diâmetro, 2 μ m de porosidade, acoplado a um Kitasato e recorrendo a bomba de vácuo. Este procedimento foi repetido mais duas vezes.

O sobrenadante foi evaporado à secura num balão tarado num rotavapor (Buchi rotavapor R-114), equipado com banho térmico (Buchi waterbath B-480).



Figura 2.12 – Amostra L5: bacalhau de cura amarela (produto final) triturado e homogeneizado.

O extracto foi separado por cromatografia de fase reversa através de uma coluna de sílica RP 18, preparada da seguinte forma: activação com 3 passagens de metanol, seguidas de eluição com 100 mL de solução aquosa de metanol 50% (p/p) e uma passagem final com 100 mL de água. O extracto (170 mg e 90 mg de **L4** e **L5** respectivamente) foi aplicado na coluna e eluído com solventes de diferentes polaridades (de 100% de H₂O a 100% de metanol). Fracções com cerca de 2 mL foram recolhidas em tubos de ensaio.

Uma pequena porção de cada uma destas fracções foi sujeita, de seguida, a cromatografia reversa em placa, sendo a fase estacionária formada por sílica (Aluminium Sheet TLC Silica RP18 MERK), e a fase móvel constituída por água e metanol (50% p/p). A aplicação foi efectuada com auxílio de uma pipeta de Pasteur e a revelação foi feita com lâmpada de UV 254 nm, isto porque as placas têm um indicador que floresce a 254 nm. Os compostos que absorvem neste comprimento de onda (todos os que têm pelo menos duas ligações duplas) "tapam" essa fluorescência e originam uma mancha escura na placa.

Os conteúdos dos tubos que apresentaram idêntico perfil de "manchas" (em termos de número e distância ao ponto de aplicação) foram juntos, em balões previamente pesados, para evaporação do metanol e água.

Pesou-se a fracção que ficou no balão após a evaporação e adicionou-se cerca de 0,5 mL de metanol deuterado (CD₃OD) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Após homogeneização a mistura foi transferida para um tubo de RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

Os compostos separados foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Os espectros de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT (“distortionless enhancement by polarization transfer”), HMBC, HMQC) foram obtidos num espectrómetro Bruker ARX 400 da rede nacional de RMN, instalado na FCT/UNL funcionando a 400MHz em ^1H RMN e a 100 Mz em ^{13}C RMN. A espectrometria de massa por ESI (ionização por electrospray) foi realizada na Universidade de Santiago de Compostela num Bruker Microtof.

2.3. Métodos de caracterização microbiológica, físico-química, nutricional e sensorial

2.3.1. Caracterização Microbiológica

As metodologias analíticas descritas em relação à quantificação e caracterização da microbiota do peixe foram comuns aos **ensaios 1, 2, 3 e 5**.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS

De acordo com o desenho experimental de cada ensaio, foram colhidas pequenas porções das zonas da asa, rabo e do lombo de cada bacalhau (ou metade de bacalhau), para constituição de amostras compostas. Todos estes passos foram efectuados em condições de assepsia recorrendo-se a material esterilizado e a uma câmara de fluxo laminar. O esquema da Figura 2.13 apresenta a técnica dos tubos múltiplos utilizada com vista a estimar o número mais provável (NMP) de microrganismos presentes nas amostras.

Optou-se pelo método do número mais provável por se considerar o mais adequado à abordagem pretendida, isto é, a uma caracterização ecológica da microbiota do peixe. O método baseia-se no princípio de que a presença de pelo menos uma célula microbiana viável resulta sempre em crescimento e, conseqüentemente, num resultado positivo, permitindo considerar todos os resultados que, por outro processo, poderiam ser inadvertidamente desprezados (Pochon e Tardieux, 1962).

Para a quantificação dos mesófilos aeróbios totais preparou-se um meio líquido baseado no meio PCA[®] comercial (Plate Count Agar, Scharlau 01-161), com 1% de NaCl (optou-se por esta percentagem de sal com base nos resultados obtidos por Rodrigues (2006) e de estudos realizados preliminarmente e não publicados); Utilizou-se o meio MRS Broth (Man Rogosa Sharpe OXOID CM0359), para determinar o teor de bactérias lácticas;

Adaptou-se a fórmula, retirando o agar, do meio comercial Agar Ferro de Lingby (Iron Agar de Lingby OXOID CM0964), para a quantificação das bactérias sulfito redutoras.

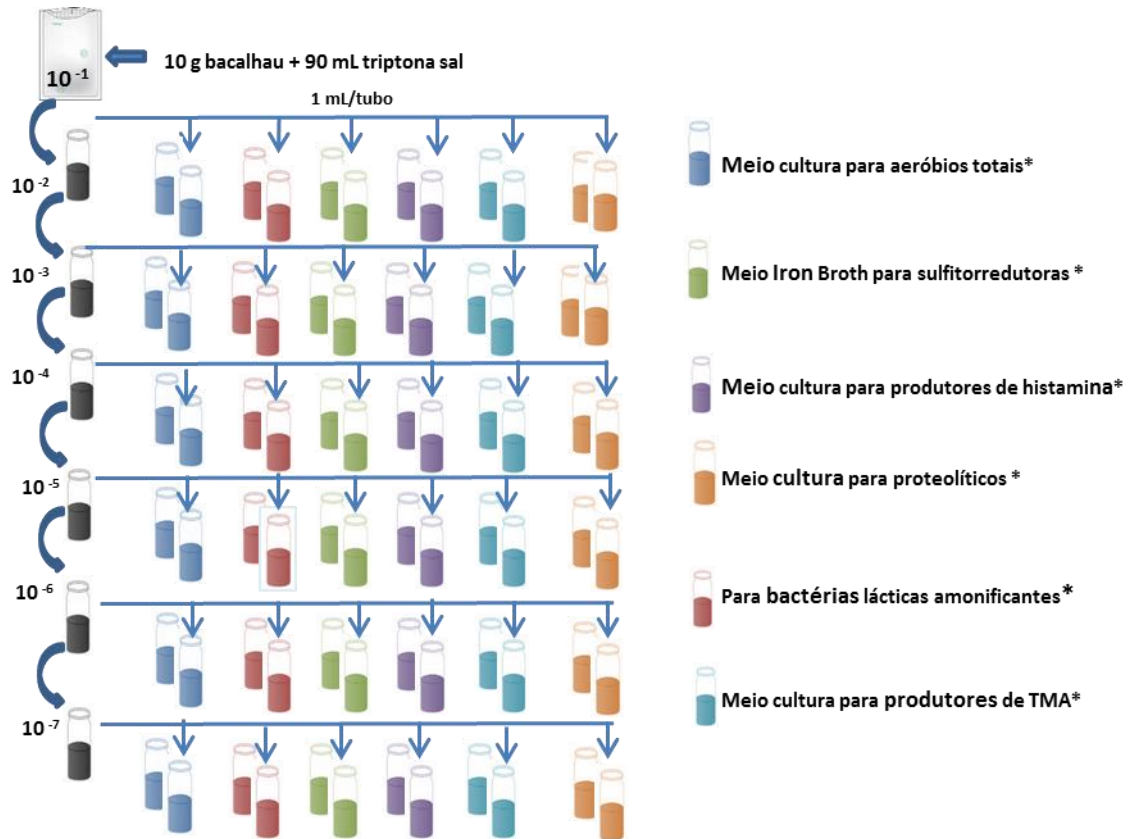


Figura.2.13 - Esquema de análises microbiológicas: quantificação dos diferentes grupos funcionais pela técnica dos tubos múltiplos (as cores indicadas não correspondem às cores reais dos meios de cultura)

A determinação do teor de bactérias proteolíticas e amonificantes baseou-se na metodologia indicada por Pochon e Tardieux (1962), para o estudo da microbiota do solo; Para a quantificação das bactérias produtores de histamina recorreu-se ao meio desenvolvido por Niven *et al.* (1981), e para as produtoras de trimetilamina seguiu-se a técnica aplicada por Dalgaard *et al.* (1994). Para a determinação dos níveis de microrganismos capazes de descarboxilar L-arginina, L-ornitina e L-lisina (efectuado apenas no ensaio 5), utilizou-se o meio Descarboxylase Base Moeller (Decarboxylase Broth Base – Himedia M393) com 1% dos citados aminoácidos de acordo com metodologia de Marino *et al.* (2000). A composição dos meios utilizados e correspondentes metodologias encontram-se descritas no Anexo I.

Todos os tubos foram colocados a incubar à temperatura de 28 °C, durante 4 dias, excepto os tubos para determinação dos microrganismos proteolíticos e amonificantes, cujo tempo de incubação foi de 15 dias (Anexo I), de acordo com Pochon e Tardieux (1962), e dos

microrganismos descarboxilantes da arginina, ornitina e lisina, que foram incubados a 37 °C realizando-se a leitura ao fim de 72 h. Neste último caso considerou-se resultado positivo sempre que houve mudança de cor para violeta.

SELECCÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES MAIS REPRESENTATIVAS DE CADA GRUPO FUNCIONAL

A partir dos tubos correspondentes às maiores diluições que apresentaram crescimento, semeou-se 0,1 mL, por espalhamento à superfície, em meios sólidos, com composição semelhante à dos meios origem e, em simultâneo, para meio agar nutritivo.

A incubação foi efectuada a 30 °C durante 3 dias. Seleccionaram-se as colónias microbianas de acordo com o aspecto morfológico (ou seja, foram isoladas todas as colónias que apresentavam aspecto diferente). Estas estirpes foram isoladas e agrupadas em diferentes grupos morfológicos.

As estirpes purificadas foram sujeitas a uma tipificação preliminar: Gram macroscópico (com KOH a 3%); caracterização microscópica; resistência a diferentes temperaturas (30 °C; 37°C; 15 °C) e a diferentes concentrações de NaCl (0%; 1%; 10%; 15%), utilizando meio de cultura Agar Nutritivo (OXOID CM 003); actividade enzimática catalase, oxidase e [com recurso aos “kits” API 20E (bioMerieux REF 20 100/20 160) e API zym (bioMerieux REF 25 200)], β-galactosidase, arginina desidrolase, lisina descarboxilase, utilização de citrato, produção de Indol, de acetoina, fermentação de manitol, de sacarose, glucose, produção de NO₂, actividade da fosfatase alcalina, esterase C4, esterase C8, leucina arilamidase e fosfatase ácida.

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS ESTIPES SELECCIONADAS, ESTABELECIMENTO DE “CLUSTERS” (GRUPOS) E IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES REPRESENTATIVAS DOS DIFERENTES “CLUSTERS”.

A partir de cada cultura microbiana pura em agar nutritivo transferiu-se uma porção de biomassa para tubos contendo 10 mL de uma solução salina (0,9% de NaCl), até obter uma suspensão celular com uma concentração correspondente ao padrão 5 da escala de McFarland (Anexo I). Transferiu-se 1 mL para tubos de centrifuga e centrifugou-se a 10 000 rpm durante 5 min, numa centrífuga (Microfuge 18 Beckman). Removeu-se o sobrenadante e os “sedimentos” obtidos foram lavados e submetidos a mais 5 min de centrifugação a 10 000 rpm. Removeu-se novamente o sobrenadante e adicionou-se 0,5 mL de água MilliQ-esterilizada. As suspensões de células assim tratadas foram congeladas

e submetidas posteriormente a 100 °C durante 10 min para provocar a lise das células, processo seguido de centrifugação durante 5 min a 10 000 rpm. A partir desta preparação de células lisadas inoculou-se 1 µl numa mistura para PCR, cuja preparação se encontra descrita de forma detalhada no Anexo I, utilizando-se o Primer CsM13 (Huey e Hall, 1989). A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador (Thermocycler Biometra), com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C, emparelhamento 35 °C, 1 min e 72 °C por 2 min, para extensão. Após amplificação, o passo final de extensão foi efectuada a 72 °C durante 4 min (Chambel *et al.*, 2007)

O produto PCR foi sujeito a electroforese em gel de agarose. Para tal transferiram-se 20 µl da mistura, após adição de 5 µl de BPB, para poços em gel de agarose (1,5%). A electroforese realizou-se a 90 V/cm durante 2:30h, numa tina horizontal (Pharmacia), com 0,5X TBE, e com uma fonte Electrophoresis Power Supply EPS600.

A revelação foi conseguida com 0,2 mg/mL de brometo de etídeo durante 10 min e os fragmentos foram visualizados com um transiluminador com lâmpadas de ultravioleta (Image System Transilluminator UV, Alliance 4,7 Uvitec Cambridge).

Os resultados de “fingerprinting” (impressão digital) foram analisados com o programa BioNumerics 6.6, construindo-se dendrogramas. Com base nos “clusters” obtidos seleccionaram-se estirpes representativas de cada “cluster” para posterior sequenciação. Inicialmente foram seleccionadas 20 estirpes, provenientes dos diferentes ensaios e consideradas representativas dos “clusters” definidos. Contudo, a análise dos primeiros resultados obrigou a aumentar o esforço de sequenciação, pelo que foram seleccionadas mais 86 estirpes.

Para a sequenciação procedeu-se primeiro à amplificação parcial do gene de rRNA 16S, utilizando “primers” seleccionados.

Os primers foram seleccionados e aplicados tendo em conta a qualidade do resultados obtidos para cada estirpe, pelo que se optou por usar o par PA (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (Massol-Deya *et al.*, 1995) e 1392 R (ACGGGCGGTGTGTRC) (Muyzer *et al.*, 1998), ou o par PA e 907 R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) (Muyzer, *et al.*, 1996).

Para a amplificação adicionou-se 1 µl da suspensão de células lisadas, de cada uma das estirpes seleccionadas, preparada anteriormente e mantida a -20°C, numa mistura para PCR (descrita de forma detalhada no Anexo I).

A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador (Thermocycler Biometra), com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C, emparelhamento a 55 °C e 72 °C durante 1 min e 30 s. Após amplificação, o passo final de extensão foi efectuado a 72 °C durante 3 min.

Os produtos da PCR assim obtidos, foram purificados com recurso a um “kit” de purificação (Jetquick Spin Column Technique PCR purification, Genomed).

O sucesso da PCR e da purificação foi testado realizando uma electroforese das amostras em gel de agarose a 1%, durante 1 h a 90 V e posterior revelação com brometo de etídio e visualização, de forma idêntica à anteriormente descrita.

As primeiras 20 estirpes seleccionadas, como explicado anteriormente, foram sequenciadas com dois “primers” 104 F (GGCGVAYGGGTGAGTAA) (Chaves, 2005) e 907R. As restantes 86 foram sequenciadas apenas com o “primer” 907R. Esta resolução foi tomada pela necessidade de reduzir o consumo de reagentes e despesas inerentes.

Os cromatogramas foram tratados e as sequências foram obtidas usando o programa CHROMAS 2.33. O alinhamento das sequências foi adquirido usando o BioEdit e o Clustal X2 Genedoc gd322700, para obtenção da sequência consenso. As sequências 16S rRNA consenso assim construídas, foram comparadas com as sequências na base de dados no GenBank. A pesquisa foi efectuada usando a funcionalidade “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) disponibilizada pelo “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Os parâmetros de pesquisa seleccionados foram: tipo de BLAST escolhido foi “nucleotide blast” e a base de dados para pesquisa foi “nucleotide collection (nr/nt)”. Foi utilizado um mínimo de 500 bp e um limite de 99% de semelhança para considerar 2 estirpes como pertencentes à mesma espécie (Janda e Abbot, 2007).

As amostras puderam ser identificadas com certeza até ao nível de g nero quando a homologia fosse superior a 97% e inferior a 99%. No caso de ser inferior a 97%, foi registada a identificação a título informativo. Tal aconteceu apenas em algumas situações em que se utilizou apenas um “primer” na obtenção da sequência.

2.3.2. Indicadores físico-químicos

As metodologias descritas para determinação da humidade, cloretos, teor de azoto básico volátil (ABVT), azoto de trimetilamina, (N-TMA) são referentes aos ensaios 1, 2, 3 e 5. O pH foi determinado no ensaio 1, 2 e 5 e a actividade da água, no ensaio 1.

O azoto dos aminoácidos livres foi quantificado no ensaio 3 e 5. As determinações de gordura, proteína e cinza total foram realizadas apenas no ensaio 3 (em bacalhau cru e demolido durante 48 horas), bem como os teores de Na, Mg e K (apenas em bacalhau demolido).

Para proceder a todas estas análises as amostras foram previamente trituradas e homogeneizadas.

Na determinação do teor de humidade e de cloretos efectuou-se o procedimento descrito na NP 2282 (IPQ, 2009a) e no DL 25/2005 de 28 de Janeiro, respectivamente.

A quantificação do N-ABVT realizou-se de acordo com a NP 2930 (IPQ, 2009b), e a do N-TMA de acordo com a NP 1841-1 (IPQ, 2009c). Na determinação do azoto de aminoácidos livres aplicou-se um método interno usado no IPMA IP que se encontra descrito no Anexo I.

O pH foi medido utilizando um potenciómetro (Metrohm 744 pH Meter), e para a determinação da actividade da água recorreu-se ao equipamento Rotronic-Hygroskop DT equipado com um sensor DMS 100 H Rotronic AG, seguindo as instruções do fornecedor dos equipamentos.

A determinação da gordura realizou-se segundo a NP 1972 (IPQ, 2009d) e a cinza total de acordo com a NP 2032 (IPQ, 2009e).

A proteína foi determinada pelo método de Dumas (Kristen e Hesselius, 1983) e com o procedimento técnico em uso na U-VPPA do IPMA, I.P. num aparelho de análise de azoto.

A quantificação do teor de Sódio (Na), Magnésio (Mg) e potássio (K), realizou-se pelo método espectrofotométrico de absorção atómica de chama, baseado na metodologia proposta por Jorhem (2000).

A determinação das aminas biogénicas, como a histamina, efectuou-se recorrendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguindo o procedimento descrito na NP 4490 (IPQ, 2009f).

Todos estes métodos indicados encontram-se descritos com mais detalhe no Anexo I.

2.3.3. Avaliação nutricional

A avaliação nutricional foi efectuada no ensaio 3 e efectuou-se com base nos teores de proteína, gordura, Na, Mg e K. E o valor energético foi calculado com base na expressão proposta pela FAO (1989):

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{P \%} + \text{G\%}) + 9 \times \text{L\%}$$

Sendo:

L%: percentagem de gordura;

P%: percentagem de proteína;

G%: percentagem de glúcidos (considerado como irrelevante)

2.3.4. Determinação da cor

Na determinação quantitativa da cor utilizou-se o equipamento Macbeth Color-Eye 3000, baseado no método colorimétrico RGB (Red Green Blue), numa sala pintada de branco, dotada de uma iluminação branca. Os resultados foram obtidos no sistema colorimétrico CIE, L*, a*, b*, após calibração do aparelho.

O L* corresponde à intensidade luminosa varia entre 0 (preto) e 100 (branco). Perpendicular ao eixo cromático L parte a, b em quatro direcções ortogonais com um + a* (vermelho) a 0°, + b* (amarelo) a 90°, - a* (verde) a 180°, - b* (azul) a 270°. Além destes atributos a combinação de a* e b* também determina parâmetros h e C*. O ângulo de tom ou h, dá o comprimento de onda predominante que compõe a cor (tonalidade, cor propriamente dita). C*, ou Cromo, ou saturação, representa a nitidez ou a pureza da cor a partir da distância entre o ponto a*,b* e a origem. Quanto maior a distância, mais nítida ou saturada é a cor (Dufossé *et al*, 2001).

A determinação da cor foi efectuada em todas as tiras de peixe do ensaio 3, quer demolhadas, quer não demolhadas, e do ensaio 5, não demolhadas. A leitura foi repetida 3 vezes para cada amostra. Com os resultados de L* a* b* obtidos, determinaram-se os valores médios destas coordenadas, que serviram para calcular o croma e a brancura pela utilização das seguintes fórmulas:

$$\text{Croma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$\text{Brancura} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

2.3.5. Avaliação sensorial do bacalhau em cru e cozido

A avaliação sensorial foi efectuada nos ensaios 3 (em que se comparou o bacalhau de cura amarela e o bacalhau de cura branca - salgado seco) e 5 (em que se estudou os indicadores microbiológicos, físico-químico e sensoriais do bacalhau de cura amarela, na interface conservação/deterioração). Esta avaliação foi realizada numa sala específica (Figura 2.14), pintada de branco, dotada de uma iluminação branca, equipada com cinco cabines de prova individuais, com acesso à “cozinha laboratorial “ contígua, através de um postigo de correr, de vidro não transparente, pelo qual são passadas as amostras. Cada uma destas cabines possui uma torneira de água potável, um pequeno lavatório de cerâmica branca, encastrado na bancada de análise e uma lâmpada individual de luz branca (para evitar formação de sombras) e um indicador luminoso (do lado da cozinha) de final de prova. O provador fez a avaliação sentado, de frente para a bancada e postigo. Na zona central da sala existe uma mesa rectangular branca.

Recorreu-se a um painel de 5 provadores, experientes, ligados ao sector de processamento do bacalhau e/ou familiarizados com o consumo de bacalhau de cura amarela.



Figura 2.14 - Sala de análise sensorial onde foi efectuada a avaliação organoléptica do bacalhau.

Em cada uma das sessões (4 no ensaio 3 e 4 no ensaio 5), foram apresentados 3 peixes previamente codificados. Metade de cada peixe foi apresentada em cru, sobre papel branco numa mesa central de cor branca, sob luminosidade adequada. Os provadores circularam e foi-lhes possível tocar e cheirar cada amostra (Figura 2.15).

De seguida, nas cabines individuais, cada provador teve acesso às amostras cozidas, correspondentes às avaliadas em cru, preparadas a partir da outra metade do peixe. Sempre que um provador terminava a avaliação de uma amostra, esta era retirada e

substituída por outra, até completar o número de amostras a avaliar, em cada sessão, num total de 3 amostras por sessão.



Figura. 2.15 - Avaliação sensorial do bacalhau em cru.

As amostras cozidas consistiam em porções paralelepípedicas, da zona do lombo, com cerca de 5 cm de largura e 8,5 cm de comprimento, similares em termos de presença de pele ou espinhas. Estas porções foram sujeitas a demolha em água fria durante 48 h. A água foi trocada de 8 em 8 h. As amostras assim preparadas foram colocadas em papelotes de folha de alumínio e sujeitas a cozedura ao vapor durante 20 min num cozedor PHILIPS Steamer HD 9140.

De acordo com as características do produto e experiência anterior, foi desenhada uma folha de prova, para o bacalhau destinado à avaliação em cru e outra para o cozido (Anexo VI). Sempre que se considerou justificável esta folha foi afinada.

Os atributos avaliados no bacalhau cru foram os seguintes: cheiro (característico, queijo, fermentado, batata, ranço), cor (amarelo palha, amarelo âmbar, creme, branco marfim) e aspecto exterior (translucência, brilho, baba, oleosidade, seca, homogeneidade). No caso do bacalhau cozido foram avaliados os seguintes atributos: cor (amarelo palha, branco marfim e creme/branco sujo), cheiro [característico, queijo, fermentado, batata, ranço e mar (salgado/iodo)], textura (melado, formação de lascas, firmeza, elasticidade, fibrosidade, untuosidade e suculência) e sabor (característico, fermentado, ranço).

Todos os atributos foram avaliados usando uma escala linear não estruturada de 12 cm (Meilgaard *et al.*, 1999), em que “0” correspondia à ausência do atributo e “12” à intensidade máxima.

2.4. Tratamento estatístico

A partir dos resultados do fingerprinting, recorreu-se ao programa BioNumerics 6.6, para a construção dendrogramas, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA).

Utilizou-se o programa Microsoft Excel 2010 na determinação dos índices Shannon Wiener, para avaliar a diversidade microbiana dos diferentes grupos formados por ensaio/fase estudada, e o índice de Simpson, com o intuito de avaliar o poder discriminatório da abordagem efectuada.

Na análise em componentes principais empregou-se o programa NTSYSpc (version 2.20d; Exeter Software, Setauket, NY, USA).

Em relação à restante caracterização microbiológica, físico-química e sensorial fez-se a análise de variância “one way ANOVA” do programa STATISTICA 7 (stat-sof,USA, 2004), depois de verificar a normalidade e homogeneidade de variância, usando o teste de Tukey, para averiguar as diferenças significativas. Quando os pressupostos não se confirmaram recorreu-se ao teste não paramétrico Kruskal-wallis. O nível de significância foi definido como 0,05 ($P \leq 0,05$)

Ali estavam sem rumo, lutando com ventos caprichosos e uma corrente marítima contrária...no meio de uma equipagem curtida e gasta pelos anos e os ventos agrestes que diziam: Isto aqui é bacalhau, é assim mesmo!"

Anselmo Vieira,
Nos Mares da Terra Nova - A Saga dos Bacalhoeiros, 2010

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio 1: Estudo de cura amarela

Neste ensaio simulou-se em laboratório o processo de cura amarela do bacalhau e fez-se alterar o ambiente da maturação através da variação da humidade relativa.

Como foi descrito anteriormente (rubrica 2.2.1 do material e métodos), realizaram-se duas experiências, sendo que numa o valor da humidade do ambiente de secagem do bacalhau foi mantido a 70%, durante os 15 dias de ensaio e na outra, a secagem iniciou-se a 75% de humidade ambiental até à formação de reima (7 dias), tendo sido depois reduzida para 70%, até aos 15 dias.

Nas amostras de bacalhau, desta segunda experiência o tom amarelo intensificou-se 48 horas após a demolha, aumentando também o seu aspecto pegajoso. Ao fim de sete dias ainda estava mole e resistia pouco ao toque. Foi evidente a formação de reima, apresentando uma cor amarelo-torrada, translúcida à superfície, e com cheiro intenso. O interior do peixe revelou-se mais branco e mole.

3.1.1. Indicadores microbiológicos

Os gráficos das fig. 3.1 e 3.2 apresentam a evolução da microbiota, em termos de grupos funcionais, do bacalhau de cura amarela, ao longo do processo. Os gráficos reflectem a evolução quando o bacalhau foi sujeito a um processo de secagem durante 2 semanas num meio com uma humidade de 70% (Figura 3.1) e quando foram sujeitos durante a primeira semana a um ambiente com 75% de humidade e na segunda semana com 70% (Figura 3.2).

As limitações do ensaio laboratorial não permitiram trabalhar com uma amostragem de maior dimensão, pelo que não foi viável fazer uma análise estatística de variância. Contudo, é possível fazer algumas considerações gerais.

Nas condições das experiências, observa-se que o perfil e proporção dos grupos funcionais bacterianos é bastante semelhante. A excepção mais evidente diz respeito ao grupo das bactérias proteolíticas, que na primeira experiência apresentam um valor médio praticamente mil vezes superior ao da segunda experiência. Na qual este grupo nem sequer foi detectado ao fim de duas semanas.

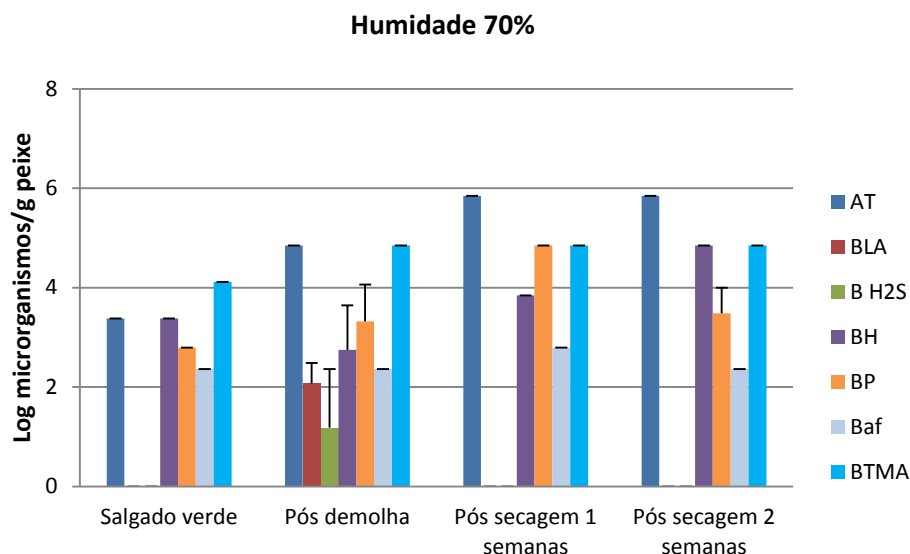


Figura 3.1 - Evolução dos diferentes grupos bacterianos funcionais ao longo do processo laboratorial de cura com humidade controlada de 70% (AT microrganismos aeróbios totais; BLA bactérias lácticas; BH₂S bactérias sulfitorredutoras; BH bactérias produtoras de histamina; BP bactérias proteolíticas; Baf bactérias amonificantes; BTMA bactérias produtoras de trimetilamina).

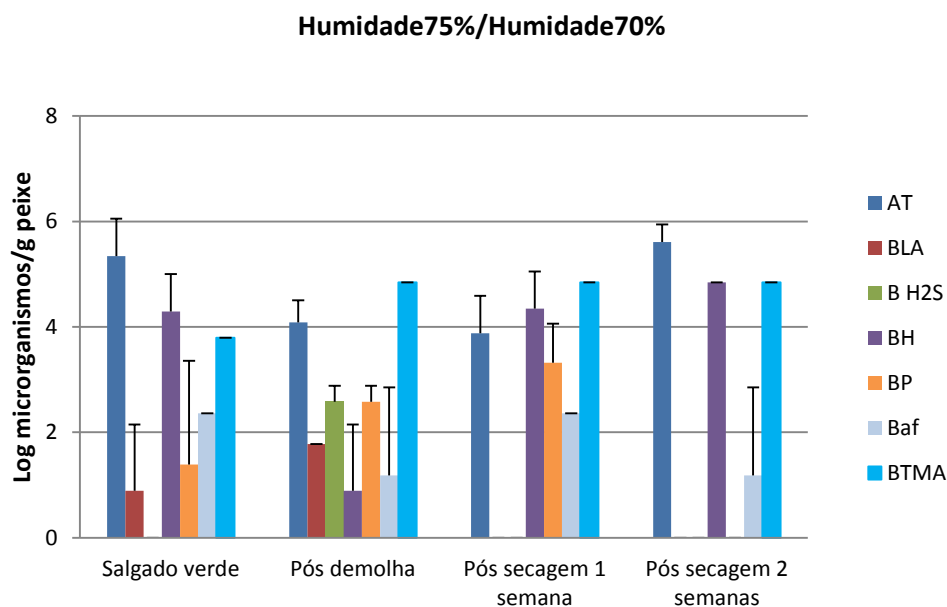


Figura 3.2 - Evolução dos diferentes grupos bacterianos funcionais ao longo do processo laboratorial de cura com humidade controlada de 75% até ao fim da 1ª semana e de 70% a partir da 2ª semana. (AT microrganismos aeróbios totais; BLA bactérias lácticas; BH₂S bactérias sulfitorredutoras; BH bactérias produtoras de histamina; BP bactérias proteolíticas; Baf bactérias amonificantes; BTMA bactérias produtoras de trimetilamina).

O grupo de bactérias sulfitorredutoras foi detectado na fase de demolha, deixando de se revelar com a secagem. Este facto põe em evidência a grande sensibilidade deste grupo à diminuição da a_w .

Verificou-se que o grupo das bactérias produtoras de trimetilamina foi o grupo mais representativo, prevalecendo nas fases de secagem numa e noutra situação, registando-se valores médios dentro da mesma ordem de grandeza.

Como os resultados mais à frente demonstram, há uma enorme incongruência em relação ao facto de não se ter detectado bactérias proteolíticas na segunda experiência. Esta situação só pode ser explicada tendo em consideração a abordagem laboratorial efectuada e o carácter exploratório em relação à aplicação dos meios de cultura, sobretudo do meio usado para proteolíticos. Estes aspectos podem ter conduzido a erros de amostragem e/ou a leitura errónea de resultados.

3.1.2. Indicadores físico-químicos

A evolução da humidade, teor de cloretos, a_w , e pH do bacalhau ao longo do processo, caracterizado num caso por uma humidade ambiental de 70%, e no outro, com uma humidade de 75% durante a primeira semana e 70% na segunda semana, encontra-se patente nas figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6.

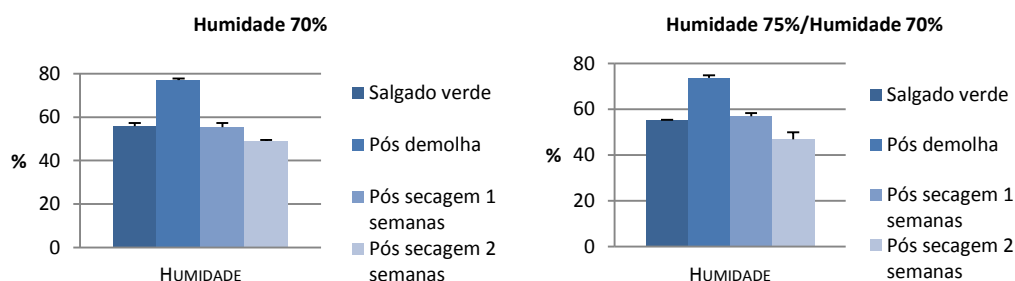


Figura 3.3 - Evolução do teor de humidade do peixe ao longo do processo laboratorial de cura.

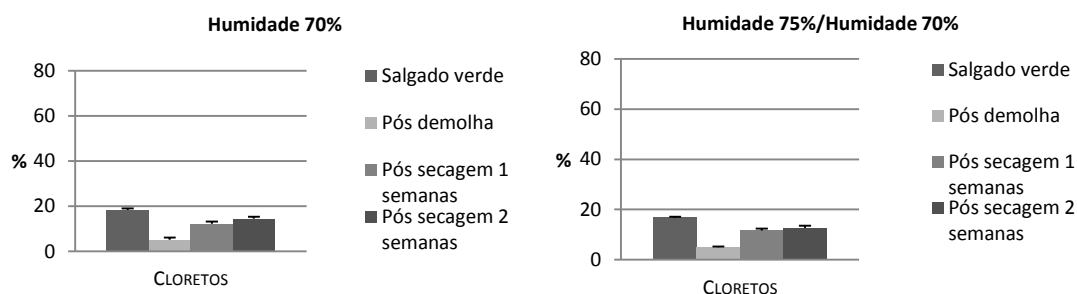


Figura 3.4 - Evolução do teor de cloretos do bacalhau ao longo do processo laboratorial de cura.

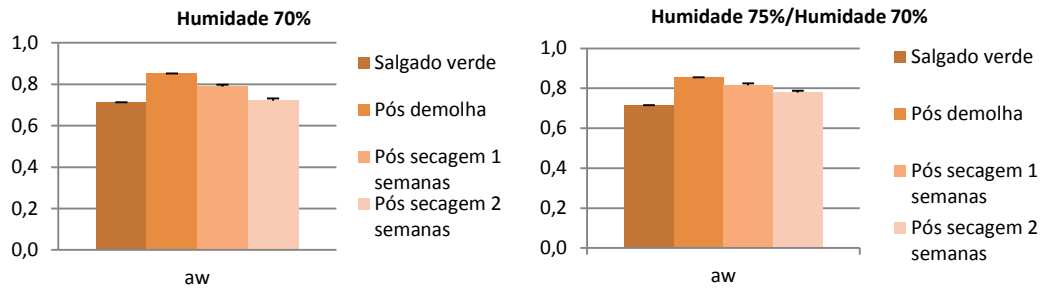


Figura 3.5 - Evolução de a_w do bacalhau ao longo do processo laboratorial de cura.

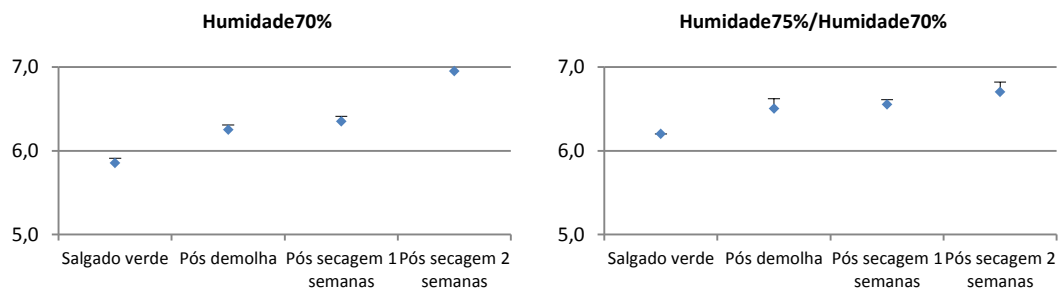


Figura 3.6 - Evolução de pH do bacalhau ao longo do processo laboratorial de cura.

A evolução dos indicadores físicos-químicos avaliados é tendencialmente idêntica numa e noutra situação, salientando-se contudo, um valor médio final de a_w mais elevado nas amostras que foram sujeitas a uma secagem inicial a 75% de humidade (Figura 3.5).

Relativamente ao pH, observa-se uma maior amplitude entre o valor médio registado na fase de salgado verde e o valor médio no final da secagem, quando a humidade durante a secagem é sempre de 70%, verificando-se um aumento entre a primeira e a segunda semana de secagem (Figura 3.6). Constata-se também que o valor médio do pH do peixe salgado verde, das amostras usadas na primeira experiência (humidade ambiente 70%), é inferior ao valor médio dos peixes usados na segunda (Figura 3.6), sugerindo que a matéria-prima usada na segunda experiência é de pior qualidade, mais susceptível à alteração microbiana, o que pode explicar a maior carga de aeróbios totais.

Por outro lado, o teor de cloretos na primeira experiência, nesta mesma fase (salgado verde), apresenta um valor superior ao da mesma fase na segunda experiência (Figura 3.4). Isto sugere a relação entre o pH e a concentração de NaCl no músculo do bacalhau após a salga, o que está em concordância com Lauritzen (2004). Segundo a autora o aumento da concentração de NaCl durante a salga faz diminuir o pH do músculo.

Os valores médios da a_w (Figura 3.5) seguem uma tendência inversa aos valores médios da concentração de cloretos ao longo do processo (Figura 3.4). Esta dinâmica vai influenciar a actividade microbiana, afectando também o valor de pH.

Verificou-se que a contagem de proteolíticos e amonificantes foi maior nas amostras da primeira experiência (humidade de secagem 70%), como se constata pela observação da Figura 3.1., o que é inesperado, tendo em conta que a humidade e a_w apresentam valores ligeiramente superiores nas secagens a 75%. Contudo, analisando estatisticamente os dois grupos de dados (ou seja entre as duas experiências), verificou-se que a diferença não é significativa ($p > 0,05$).

Importa ainda sublinhar dois aspectos que inviabilizam a extrapolação dos resultados obtidos, para o que se passa em ambiente industrial. Um deles é de que a secagem artificial no processo industrial realiza-se a valores de humidade inferiores aos utilizados nestas experiências. O outro aspecto prende-se com o facto de não se ter efectuado as experiências com peixes inteiros, ou seja, o peixe foi cortado em fracções correspondentes aos lombos, “asas” e “rabos”, dado o carácter preliminar deste ensaio.

3.2. Ensaio 2: Evolução da população microbiana e dos parâmetros físico-químicos ao longo do processo de cura amarela em ambiente industrial

Pretendeu-se com este ensaio estudar o processo de cura amarela em ambiente industrial e avaliar a evolução de parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

3.2.1. Indicadores microbiológicos

A evolução dos aeróbios totais (AT), bactérias proteolíticas (BP), bactérias amonificantes (Baf), bactérias sulfitorredutoras (BH₂S), bactérias formadoras de histamina (BH), bactérias produtoras de trimetilamina (BTMA) e bactérias lácticas (BLA), ao longo do processo de cura é apresentada nas Figuras 3.7 e 3.8.

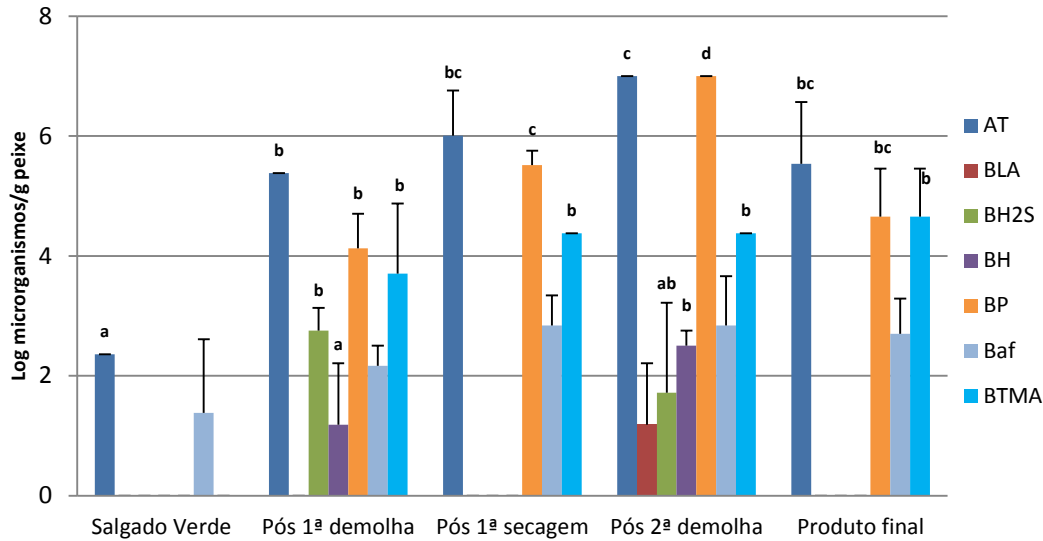


Figura 3.7 - Evolução dos grupos funcionais de bactérias durante o processo de cura (indústria R). Letras iguais junto aos valores médios de um mesmo grupo funcional indicam que não há diferenças estatísticas entre as amostras das diferentes etapas ($p > 0,05$).

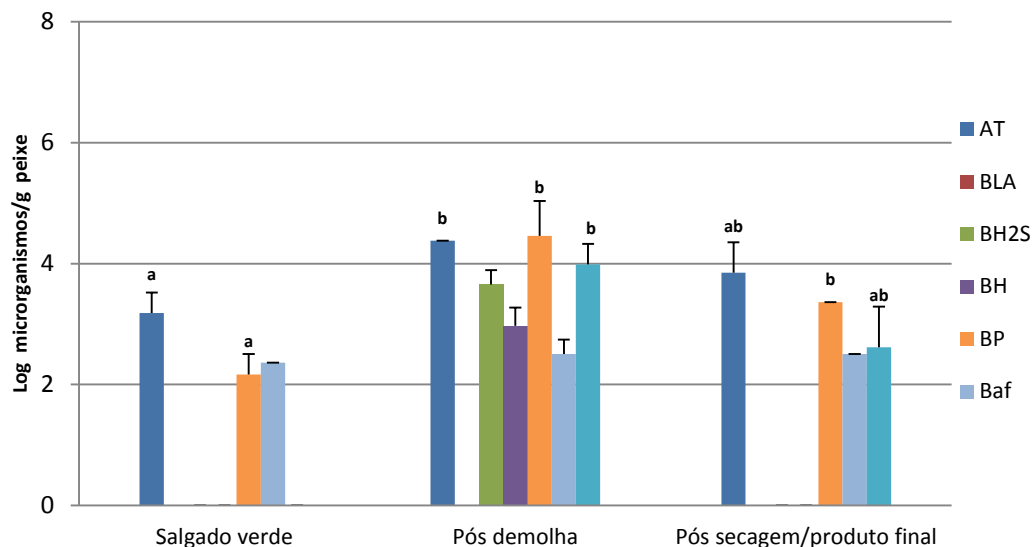


Figura 3.8 - Evolução dos diferentes grupos funcionais de bactérias durante o processo de cura (indústria L). Letras iguais junto aos valores médios de um mesmo grupo funcional indicam que não há diferenças estatísticas entre as amostras das diferentes etapas ($p > 0,05$).

Em termos qualitativos o perfil microbiano das amostras provenientes da indústria **R** é semelhante ao das amostras oriundas da indústria **L**, embora não o seja em termos quantitativos. Nas fases de demolha detectou-se uma maior diversidade de grupos microbianos, que foi reduzindo nas fases subseqüentes de secagem. Esta observação está de acordo com a regra de que os factores ambientais são determinantes na origem de uma microbiota característica de um dado substrato microbiano ou produto alimentar.

O peixe salgado verde revelou uma menor variedade de grupos funcionais de bactérias, quando comparado com o produto final da cura amarela. Isto deveu-se, por certo, ao maior

teor de sal do bacalhau salgado verde, da ordem dos 18-20%, comparativamente ao do produto final, de cerca de 16% de NaCl, que condiciona o desenvolvimento microbiano.

Os grupos das bactérias sulfito reductoras e produtoras de histamina apresentaram teores detectáveis apenas nas fases de demolha. Estes resultados confirmam o que foi inferido por Pedro *et al.*, (2002), ou seja, que a demolha cria condições que favorecem as bactérias de deterioração, podendo ocorrer a introdução ou ressurgimento de espécies capazes de produzir odores estranhos e desagradáveis, H₂S e aminas biogénicas. Estes resultados também sugerem que muitos dos microrganismos que ressurgem após a dessalga estavam em fase latente e perfeitamente viáveis.

O produto final da cura amarela apresentou teores de bactérias proteolíticas, produtoras de trimetilamina e aeróbios totais significativamente mais elevados ($p < 0,05$) do que os peixes na fase de salgado verde, sendo que, os aumentos mais significativos ocorreram durante as demolhas, o que está de acordo com vários estudos anteriores (Vilhelmsson *et al.*, 1997; Skjerdal *et al.*, 1997; Pedro *et al.*, 2002).

O grupo das bactérias lácticas foi detectado apenas na segunda demolha realizada na indústria **R**, sugerindo que a sua actividade metabólica é irrelevante para as características do produto final. Ao contrário do que acontece com muitos produtos de origem vegetal, como azeitonas, pickles, massa de pimentão, silagem, etc., em que a presença de sal é um factor estimulador do aparecimento de bactérias lácticas (que vão acidificar o meio e assegurar a conservação dos alimentos fermentados), no bacalhau o sal parece ser um factor de inibição das bactérias lácticas. Seria interessante perceber a razão de tal comportamento, que poderá justificar-se por estarem envolvidas espécies diferentes, por a concentração de sal ser muito mais elevada e/ou por não existir um substrato glicídico facilmente utilizável pelas bactérias lácticas.

Com base nos diferentes aspectos das colónias bacterianas no meio sólido, correspondente ao meio de cultura utilizado na quantificação pelo NMP (número mais provável), seleccionaram-se 70 estirpes, que foram codificadas com um número entre 1 e 100, cuja caracterização detalhada se encontra no Anexo II.

Como era de prever, o grupo que apresentou um maior número de diferentes tipos morfológicos foi o dos aeróbios mesófilos totais, pois a composição do meio é propícia ao

desenvolvimento de um elevado número de diferentes espécies microbianas. No que respeita aos produtores de trimetilamina (BTMA), 82% das estirpes foram isoladas a partir da fase de demolha, tal como todas as bactérias formadoras de histamina, o que está provavelmente relacionado com as condições favoráveis que se criam nesta fase devido à remoção do sal e aumento da a_w .

Sempre que aplicável foi isolada uma estirpe de cada tipo morfológico diferente, por cada fase do processo, grupo funcional e amostra, o que justifica as diferentes diluições de origem patentes na Tabela 3.1. O diferente número de estirpes seleccionadas, numa determinada fase do processo, dentro de um determinado grupo funcional, reflecte a maior ou menor variedade de tipos morfológicos registados.

Tabela 3.1 - Caracterização expedita das estirpes seleccionadas, por grupo funcional, segundo a fase do processo.

| Fase Processo | Nº de estirpes seleccionadas/grupo funcional | Gram+ | Catalase+ | Oxidase+ | apresentam crescimento em meio Agar Nutritivo | | | | | | | | Diluição origem |
|-----------------------|--|-------|-----------|----------|---|-------|-------|---------|---------|----------|----------|--|-----------------|
| | | | | | 15 °C | 30 °C | 37 °C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | | |
| Salgado Verde | AT (n=3) | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 10 ⁻³ | |
| | AT (n=5) | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 10 ⁻³ ,10 ⁻⁴ | |
| | BH (n=3) | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | BH ₂ S (n=3) | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 0 | 10 ⁻⁴ | |
| | BP (n=6) | 2 | 6 | 3 | 5 | 6 | 3 | 6 | 6 | 5 | 2 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| 1ª Demolha | BTMA (n=7) | 0 | 2 | 7 | 7 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 2 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | AT (n=6) | 2 | 6 | 2 | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 | 4 | 2 | 10 ⁻³ ,10 ⁻⁴ ,10 ⁻⁶ ,10 ⁻⁷ | |
| | BH ₂ S (n=6) | 4 | 6 | 4 | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 | 6 | 2 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | BP (n=6) | 2 | 6 | 3 | 6 | 6 | 2 | 6 | 6 | 2 | 2 | 10 ⁻⁴ | |
| | BTMA (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | Baf ** | | | | | | | | | | | | |
| 2ª Demolha | AT (n=2) | 1 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 10 ⁻⁷ | |
| | BH (n=7) | 6 | 7 | 1 | 7 | 7 | 5 | 7 | 7 | 7 | 4 | 10 ⁻² | |
| | BH ₂ S (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 10 ⁻² ,10 ⁻⁴ | |
| | BP (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 10 ⁻⁴ ,10 ⁻⁷ | |
| | BTMA (n=7) | 2 | 7 | 5 | 7 | 7 | 2 | 7 | 6 | 6 | 2 | 10 ⁻⁴ | |
| 2ª | AT (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻⁴ | |
| Secagem/produto final | BH ₂ S (n=2) | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 10 ⁻² | |
| | BP (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 ⁻⁵ | |

Legenda: **sem crescimento em meio sólido; n (número total de estirpes seleccionadas e testadas, por grupo funcional dentro de cada fase do processo) AT (aeróbios totais); BH (bactérias produtoras de histamina); BTMA (bactérias produtoras de trimetilamina); BH₂S (bactérias sulfito-redutoras/crescimento em Iron Agar); BP (bactérias proteolíticas)

A maior parte das estirpes isoladas (Tabela 3.1), apresentou capacidade para se desenvolver a temperaturas de 15 °C e 30 °C. Existe menor tolerância a temperaturas de 37 °C. Idêntica constatação foi feita por Bjorkevoll *et al.* (2003), num estudo realizado com bacalhau salgado e demolhado, indiciando que as baixas temperaturas das águas em que vive o bacalhau terão um efeito selectivo importante sobre a microbiota do peixe e do processo.

Todas as estirpes isoladas se desenvolveram em meio de cultura com 0% de NaCl e apenas 26% apresentaram desenvolvimento em 15% de NaCl, sugerindo que são sobretudo haloresistentes, ou seja, não exigem elevadas concentrações de sal para sobreviver. Contudo, é de salientar que, provavelmente, apenas uma parte da microbiota do bacalhau foi revelada, porque os meios de análise apresentam limitações, que impossibilitam abranger toda a panóplia de microrganismos presente, sobretudo se não forem cultiváveis, ou se estiverem presentes mas com a sua actividade inibida.

A maioria das estirpes testadas foi catalase positiva o que vai ao encontro de resultados de outros estudos semelhantes (Pedro *et al.*, 2002; Bjorkevoll *et al.*, 2003), nos quais se caracterizaram estirpes microbianas isoladas a partir de amostras de bacalhau salgado seco e de bacalhau salgado seco demolhado.

Para uma caracterização fenotípica mais detalhada escolheram-se 50 estirpes, das 70 referidas anteriormente, de forma a serem representativas dos diferentes grupos funcionais, origem e diluição. Estas estirpes foram caracterizadas enzimaticamente com recurso a galerias comerciais API (API 20 E e API Zym), (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Caracterização enzimática das estirpes seleccionadas. *

| | AT n=12 | BH n=6 | BTMA n=9 | BH ₂ S n=11 | BP n=12 |
|------------------------------------|------------|-----------|-------------|---------------------------|------------|
| Arginina dihidrolase | 1 | 0 | 5 | 5 | 2 |
| Lisina descarboxilase | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ornitina descarboxilase | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Triptofano desaminase | 7 | 4 | 8 | 6 | 7 |
| Produção de indol | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Produção de acetoina | 2 | 2 | 3 | 6 | 5 |
| Fermentação de manitol | 4 | 3 | 0 | 4 | 0 |
| Fermentação de sacarose | 3 | 3 | 0 | 5 | 2 |
| Produção NO₂ | 5 | 2 | 3 | 6 | 3 |
| Fosfatase alcalina | 9 | 5 | 6 | 11 | 7 |
| Esterease C4 | 10 | 5 | 6 | 11 | 11 |
| Esterease C8 | 8 | 3 | 6 | 11 | 10 |
| Leucina arilamidase | 11 | 3 | 6 | 9 | 9 |
| Acido fosfatase | 6 | 5 | 5 | 9 | 5 |
| Naftol-AS-BI-fosfohidrolase | 12 | 5 | 6 | 10 | 12 |

Legenda: n (número total de estirpes testadas por grupo funcional); AT (aeróbios totais); BH (bactérias produtoras de histamina); BTMA (bactérias produtoras de trimetilamina); BH₂S (bactérias sulfito-redutoras/crescimento em Iron Agar); BP (bactérias proteolíticas); *Apenas 50 das 70 estirpes inicialmente isoladas foram testadas

Das 50 estirpes sujeitas a testes bioquímicos das galerias API (Tabela 3.2), 64% foram triptofano desaminase positivas, 86% esterase C4 positivas e 76% esterase C8 positivas. A maior parte das estirpes foi incapaz de fermentar as fontes de carbono presentes nos “kits” API (20 E), sugerindo que boa parte delas serão aeróbias obrigatórias.

Importa acrescentar que esta caracterização não se estendeu ao total de estirpes isoladas por motivo de limitação de recursos disponíveis.

Os perfis de DNA de cada uma das 70 estirpes seleccionadas foram obtidos por electroforese, revelados com brometo de etídio e visualizados num transiluminador.

A Figura 3.9 ilustra o dendrograma que expressa a semelhança genotípica de diferentes estirpes, obtido pela análise do PCR fingerprinting, (impressão digital), correspondente às estirpes Gram⁺. De acordo com os diferentes “clusters” observados, seleccionaram-se 28 estirpes para identificação, por sequenciação do gene 16S rDNA. Esta selecção foi feita com base no número de estirpes por “cluster” e percentagem de semelhança entre as estirpes de um mesmo “cluster”.

Por observação do dendrograma foi possível fazer uma atribuição das estirpes não identificadas por sequenciação, aos géneros bacterianos encontrados, tendo em conta que se encontram num mesmo “cluster”, apresentando assim uma maior semelhança genotípica.

A comparação entre uma e outra análise (Anexo IV), não apresenta diferenças consideráveis, o que permite sustentar que a fracção de estirpes sequenciada foi suficientemente representativa e discriminativa.

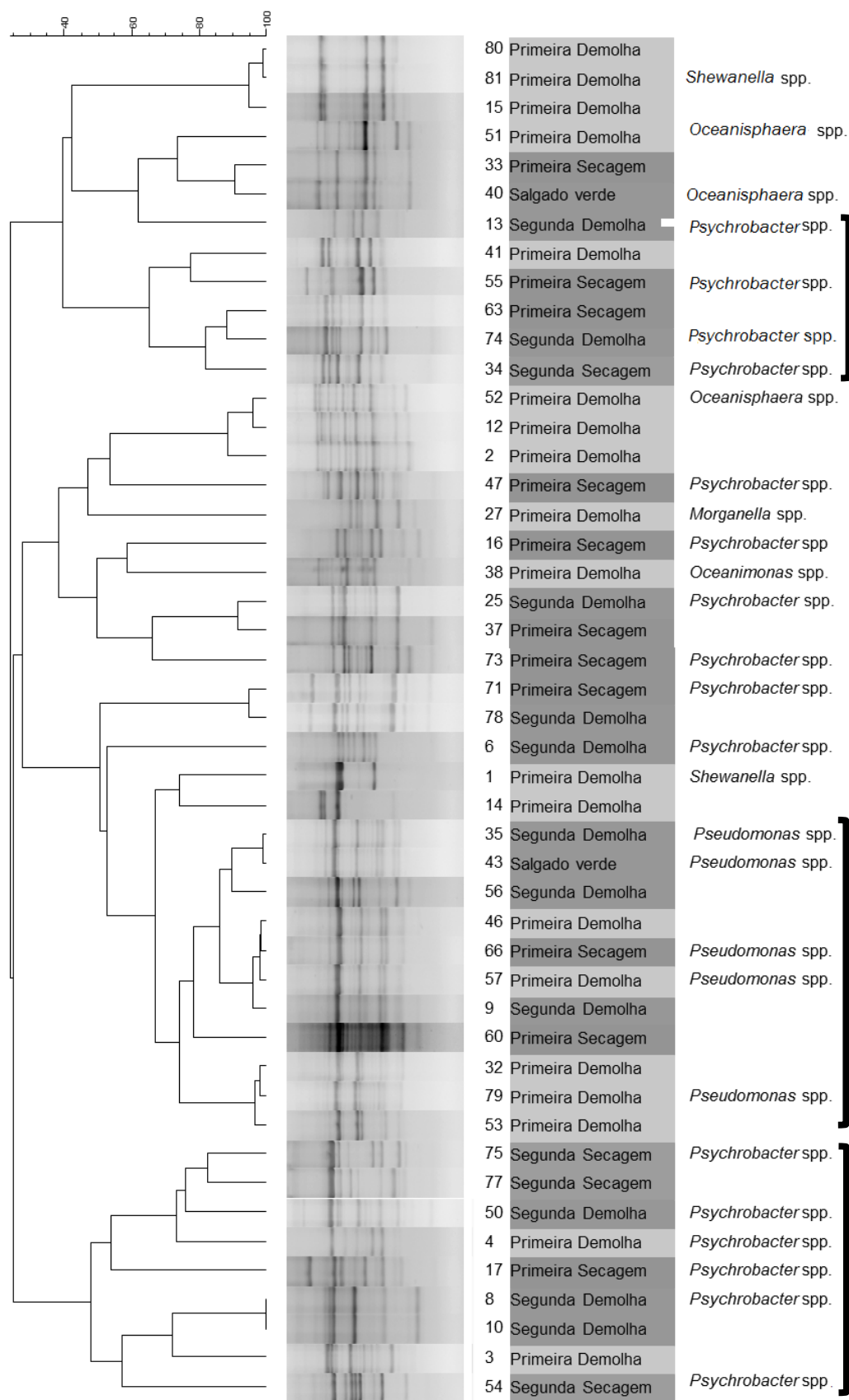


Figura 3.9 - Dendrograma baseado no PCR fingerprinting das estirpes Gram – isoladas a partir das diferentes fases de elaboração do bacalhau de cura amarela (a identificação até ao nível de género indicada foi obtida pela sequenciação do gene 16S r DNA). A fase de segunda secagem corresponde ao produto final.

Das 28 estirpes sequenciadas 54% foram identificadas como pertencentes a *Psychrobacter* spp., 17% a *Pseudomonas* spp., 13% a *Oceanisphaerae* spp. e 10% a *Shewanella* spp..

O género *Psychrobacter* aparece nas fases de demolha e de secagem e foi isolado a partir de meio de cultura para aeróbios totais (PCA), mas também em meio de cultura para bactérias proteolíticas e bactérias produtoras de trimetilamina. As bactérias deste género são Gram–, oxidase–, catalase+ (Bergey's, 1986), halotolerantes e psicrotolerantes, apresentam actividade lipolítica, mas não proteolítica, e não estão associadas à produção de trimetilamina, (Broekhaert *et al.*, 2012), pelo menos em quantidades consideráveis quando comparadas com as produzidas por *Shewanella putrefaciens* ou *Photobacterium phosphoreum* (Bover-Cid *et al.*, 2001). Este género bacteriano não foi detectado por Rodrigues *et al.* (2003), num estudo em que utilizaram o meio de cultura PCA com 1% de NaCl para isolar 179 estirpes a partir de bacalhau salgado verde, salgado seco e demolido, o que é surpreendente dado que, num outro estudo desenvolvido por Bjorkevoll *et al.* (2003), em que o meio de isolamento foi PCA, com 0,9% ou 3%, e a identificação foi realizada tendo por base o perfil lipídico, a presença de *Psychrobacter* spp. revelou-se dominante no bacalhau salgado seco e demolido. Todavia, Rodrigues *et al.* (2003), reconhecem que a metodologia aplicada, baseada na utilização do equipamento Vitek, nem sempre permitiu uma identificação das espécies com capacidade para se adaptar aos meios com elevadas concentrações de sal e que por esta razão, muitas das estirpes isoladas Gram + e Gram – não foram identificadas. Isto sustenta a ideia de que algumas das estirpes deveriam pertencer ao género *Psychrobacter* e mais uma vez confirma o princípio de que as condições experimentais influenciam decisivamente os resultados obtidos, mesmo quando a concentração de determinados géneros é elevada. Este exemplo reforça a dificuldade da caracterização completa da microbiota do peixe, principalmente, a falta de sentido ecológico de estudos que não levem em linha de conta os géneros ou espécies quantitativamente dominantes.

A presença de *Psychrobacter* spp. pode conferir ao peixe alterado um odor desagradável, descrito por Bjorkevoll *et al.* (2003) como bolorento⁷.

Este género bacteriano foi também encontrado no muco da pele do bacalhau recém capturado e verificou-se que sobrevive ao processo de salga, pois resiste a elevadas concentrações de sal (Bjorkevoll *et al.* 2003), o que pode explicar a razão pela qual, foi isolado, no presente estudo, em amostras provenientes de todas as fases do processo de

⁷No original "musty"

elaboração do bacalhau de cura amarela, sugerindo que se trata de um género característico e dominante neste tipo de produto.

Neste estudo, duas das estirpes (numeradas com 66 e 57 – Figura 3.9), identificadas como pertencentes ao género *Pseudomonas* por sequenciação do gene 16S rDNA, e três (53, 56 e 60), atribuídas a este género por apresentarem uma elevada semelhança genotípica (>80%), encontrando-se no mesmo “cluster” (Figura 3.9), foram isoladas usando o meio de cultura para proteolíticos. Este facto contribui para inferir sobre o papel importante que desempenham na proteólise do peixe, podendo levar à formação de aldeídos, cetonas e ésteres (Gram e Huss, 1996).

Rodrigues *et al.*, (2003), ao caracterizarem a microbiota do bacalhau salgado seco e demolido, identificaram 21% das 179 estirpes isoladas, como pertencendo ao género *Pseudomonas* e 4% como pertencendo ao género *Shewanella*. Estes géneros microbianos são referenciados em diversos estudos pela elevada capacidade para descarboxilar aminoácidos (Santos, 1998; López- Caballero *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003). Num dos poucos estudos sobre a microbiologia do bacalhau de cura amarela (Gaspé), desenvolvido por Dussault (1962), *Pseudomonas* spp. foi um dos géneros microbianos que apresentou maior incidência.

As bactérias do género *Oceanisphaerae* são haloresistentes e exibem colónias amarelas podendo ocorrer difusão do pigmento amarelo no meio (Romanenko *et al.*, 2003). É frequente encontrar-se nos sedimentos marinhos, indiciando que a presença deste género microbiano no bacalhau terá como origem o ambiente natural do peixe. Similar dedução pode ser efectuada em relação ao género *Pseudomonas*, dado que também foram isoladas diversas bactérias deste género em bacalhau fresco recém-capturado (Dyer, 1947). Provavelmente os locais de processamento do peixe acabam por ficar inadvertidamente contaminados com esta flora típica e natural do peixe, podendo reflectir-se na microbiota do peixe processado. Um estudo realizado por Bagge-Ravn *et al.* (2003), que visou avaliar a ecologia microbiana do equipamento e local de processamento de diferentes indústrias de peixe, prova esta situação, dado que, uma percentagem representativa (16 – 18%) de microrganismos do género *Pseudomonas* foi isolada em diversos locais e prevaleceu depois da limpeza e desinfeção. Isto deveu-se, tal como salientam os autores, à sua reconhecida resistência a diversos factores de stress, como presença de desinfetantes, bem como, por aderirem facilmente a superfícies e serem excelentes formadores de biofilmes.

Observa-se que as estirpes identificadas como sendo dos géneros *Shewanella*, *Morganella* e *Oceanimonas* foram isoladas nas fases de demolha. A elevada actividade sulfitorredutora, descarboxiladora de aminoácidos e redutora de OTMA, associada a estes grupos microbianos (Debevere e Boskou, 1996; Gram e Huss, 1996; López-Sabater, 1996; Santos, 1998; López-Caballero *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003), reforça uma vez mais, o que foi inferido por Pedro *et al.*, (2002), ou seja, de que a demolha do peixe salgado proporciona condições que favorecem as bactérias de alteração.

A análise dos resultados de PCR “fingerprinting”, relativos às bactérias Gram +, analisados com o programa BioNumerics 6.6, conduziu ao dendrograma da Figura 3.10.

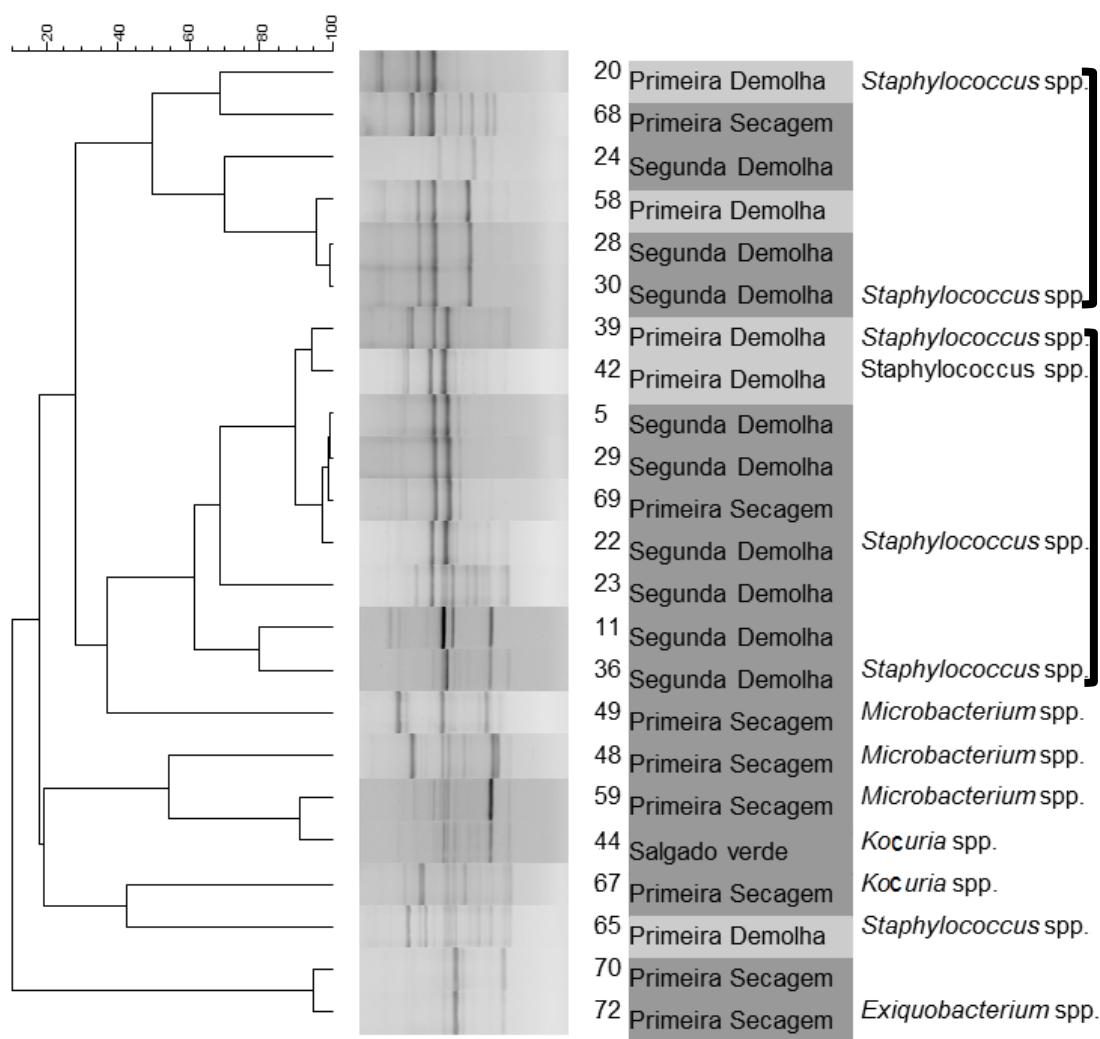


Figura 3.10 - Dendrograma baseado no PCR fingerprinting das estirpes Gram + isoladas a partir das diferentes fases de elaboração do bacalhau de cura amarela (a identificação até ao nível de género indicada foi obtida pela sequenciação do gene 16S rDNA).

Seleccionaram-se estirpes de forma idêntica à efectuada para as estirpes Gram -, para sequenciação do gene 16S rDNA.

Também neste caso a comparação entre a identificação obtida por sequenciação das 13 estirpes seleccionadas e a identificação conseguida por atribuição com base na percentagem de semelhança patente no dendrograma, não revelou consideráveis diferenças, o que permite sustentar que a abordagem utilizada foi suficientemente discriminativa (Anexo IV).

Para avaliar a diversidade microbiana evidenciada nos dendrogramas construídos a partir do PCR fingerprinting, recorreu-se ao cálculo do índice de Shannon Wiener, por ser sensível à proporção de indivíduos de cada espécie. Para tal determinou-se o número de estirpes, por grupos, definidos por uma linha de corte aos 80% de semelhança. Esta avaliação foi feita para cada fase do processo de preparação do bacalhau de cura amarela, separando as bactérias Gram + das Gram - . Foi também calculado o índice de Simpson, com o intuito de avaliar o poder discriminatório desta abordagem (Anexo IV). A linha de corte a 80% foi definida tendo em conta que a mediana da percentagem de semelhança entre duplicados foi de 85%.

Os índices determinados com base na semelhança genotípica apresentada pelas estirpes isoladas revelaram que existe uma maior diversidade na fase de salgado verde e na primeira secagem, no que respeita às bactérias Gram -, sendo que, em relação às Gram + é a primeira secagem a fase que apresenta uma maior diversidade.

Atenda-se ao facto da determinação desta diversidade resultar da percentagem de semelhança entre as estirpes isoladas, evidenciada pela análise de fingerprinting e que pode não corresponder à variedade de géneros bacterianos identificados pela sequenciação do gene 16S rDNA.

O poder discriminatório desta análise é mais baixo para as fases de segunda secagem (no caso das Gram -) e segunda demolha (no caso das estirpes Gram+). Esta análise encontra-se apresentada de forma mais detalhada no Anexo IV.

A maior percentagem das 13 estirpes sequenciadas foi identificada como pertencendo aos géneros bacterianos *Staphylococcus* e *Microbacterium* (77%) e, as restantes, como pertencentes aos géneros *Exiguobacterium* e *Kocuria*.

O género *Exiguobacterium* é capaz de se desenvolver em ambientes de elevada concentração de NaCl, apresentando capacidade para produzir H₂S e actividade proteolítica (Yumoto *et al.*, 2004).

Diversas espécies do género *Staphylococcus* spp foram isoladas em vários estudos sobre a microbiologia do bacalhau salgado, nomeadamente *Staphylococcus auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. sciurii* (Rodrigues *et al.*, 2003), *S. warneri* (Monraia, 1997; Rodrigues *et al.*, 2003) e *S. arlettae* (Vilhelmsson *et al.*, 1997) e é reconhecido pela sua elevada halotolerância (Bagge-Ravn *et al.*, 2003). Este género bacteriano é apontado como tendo capacidade para descarboxilar histidina em produtos cárneos, sendo também associado ao desenvolvimento das características sensoriais durante o processo de cura de carnes (Tiecco *et al.*, 1986 cit in Santos, 1998). No presente estudo, algumas das estirpes atribuídas a este género bacteriano foram isoladas durante a fase de secagem do bacalhau, onde apresentavam concentrações celulares da ordem de 10^3 cél./g de bacalhau (consultar Tabela 1 do Anexo II, informação das estirpes nº 68 e 69), pelo que se pode depreender que influenciem a cura do bacalhau. Vilhelmsson *et al.*, (1997) num estudo sobre a microbiota halotolerante do bacalhau, concluíram que o género *Staphylococcus* spp. tem como origem a microbiota natural do peixe ou o sal utilizado na salga.

Algumas espécies do género *Microbacterium*, evidenciam grande tolerância a elevada concentração de sal (Li *et al.*, 2005), o que explica a sua prevalência nas amostras de bacalhau da fase de secagem. Dyer (1947), foi o primeiro a isolar este género em peixe do mar, mais propriamente no “slime” do bacalhau fresco. O autor descreveu as estirpes isoladas como produtoras de trimetilamina e produtoras de amónia a partir de peptona, apresentando colónias de cor laranja. Espécies do género *Microbacterium* e *Kocuria* têm sido relacionadas com a produção de pigmentos amarelos em queijo, durante a sua maturação (Dufossé *et al.*, 2010).

No presente ensaio foram encontrados concentrações de *Microbacterium* spp. da ordem de 10^3 - 10^4 cél./g e de *Kocuria* spp de 10^3 e 10^6 cél./g de bacalhau nas fases de salgado verde e 1ª secagem respectivamente (consultar Tabela 1 do Anexo II, informação das estirpes isoladas).

3.2.2. Indicadores físico-químicos

Os resultados das análises físico-químicas encontram-se patentes nas Figuras 3.11 a 3.15. Verifica-se que o teor de humidade apresentado pelas amostras de bacalhau apresenta incrementos após as demolhas, diminuindo com as secagens subsequentes.

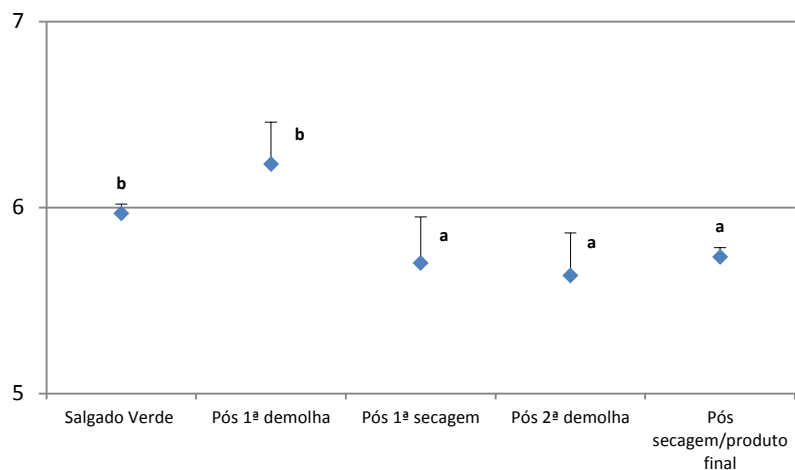


Figura 3.11 - Evolução do pH ao longo do processo de cura na indústria R; As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

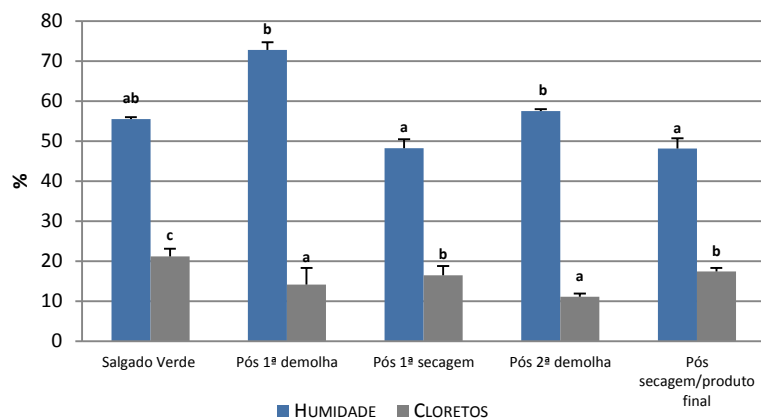


Figura 3.12 - Evolução do teor em humidade e de cloretos ao longo do processo de cura nas indústrias R; As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

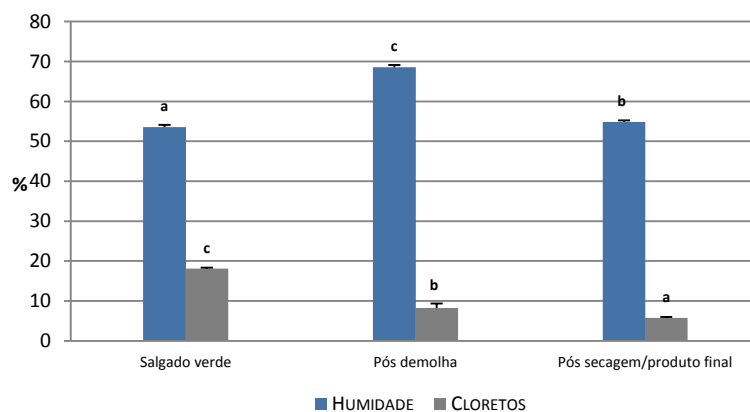


Figura 3.13 - Evolução do teor em humidade e de cloretos ao longo do processo de cura nas indústrias L; As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

Quanto ao conteúdo de sal há uma diminuição com as demolhas. No caso das amostras de empresa **R** estas diminuições são seguidas por aumentos significativos ($p < 0,05$) com a secagem (Figura 3.12). Na empresa **L** (Figura 3.13), o mesmo não foi observado, pois as amostras apresentam um teor de sal significativamente inferior ($p < 0,05$) na fase pós-secagem/produto final. Relembre-se que os peixes da empresa **L** analisados foram de massa inferior, o que pode ter facilitado a remoção de sal, aquando da demolha. Em termos microbiológicos esta diferença não se reflectiu no perfil qualitativo dos grupos funcionais de bactérias (Figuras 3.7 e 3.8).

A diminuição do teor de sal no peixe após demolha vem descrito em trabalhos de Botelho (1965b), que indicam reduções de 20% para cerca de 17,5%, reflectindo a remoção de sal que ocorre. Parece que a variação das propriedades químicas do peixe ao longo do processo depende da forma como este é conduzido. Legendre (1955) defende que a fase de prensagem é extremamente importante para o aumento da taxa de secagem influenciando a humidade final do produto.

Os teores de ABVT e N-TMA, determinados nas amostras de bacalhau encontram-se nos gráficos das figuras 3.14 e 3.15.

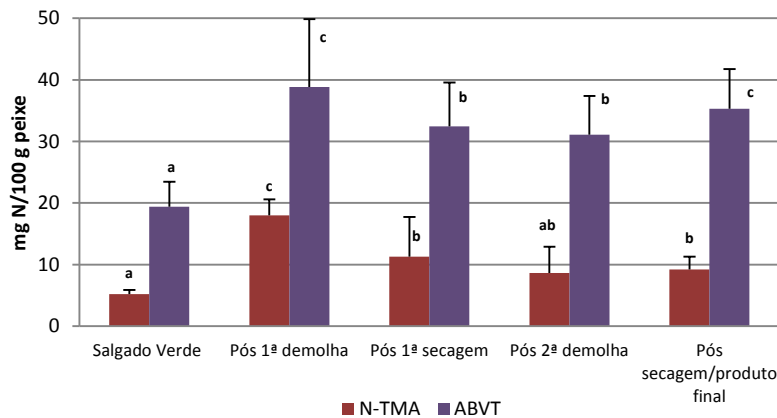


Figura 3.14 - Evolução do teor de ABVT e N-TMA ao longo do processo de cura na indústria R. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

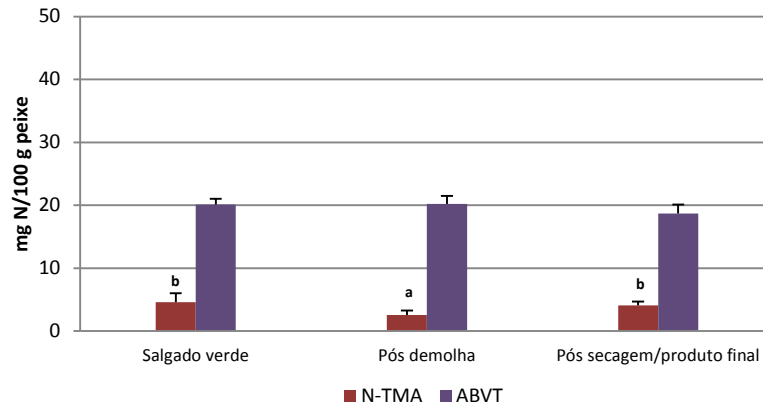


Figura 3.15 - Evolução do teor de ABVT e N-TMA ao longo do processo de cura na indústria L. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

Verifica-se que as amostras de bacalhau salgado verde analisadas, exibem valores de ABVT e de N-TMA semelhantes, quer nas provenientes da indústria **R**, como da **L** (Figuras 3.14 e 3.15). No entanto, após a demolha os peixes da fábrica **R** revelam um aumento significativo ($p < 0,05$), de N-TMA apresentando uma diferença de 15% em comparação com os peixes da fábrica **L**. Esta diferença apesar de menos acentuada permanece até à fase de produto final. Esta observação permite inferir que as condições da demolha (tempo e frequência das trocas de água) são a razão desta diferença. Mas mais importante do que isso é a causa de tais resultados, que sugere uma inegável intensa actividade enzimática, microbiana e/ou não microbiana.

A TMA é formada por algumas bactérias de deterioração que utilizam OTMA como o aceitador final de electrões, conduzindo à formação de cheiros desagradáveis (“off-odours”) e sabores desagradáveis (Dalgaard *et al.*, 1994; Gram e Huss, 1996; Debevere e Boskou, 1996). Comparando o conteúdo de N-TMA com o teor de bactérias formadoras de TMA, ao longo do processo de cura (rubrica 3.2.1.), verifica-se uma tendência semelhante, especialmente em amostras de fábrica **R**. Há um aumento significativo após primeira demolha e manutenção destes níveis até ao produto final. Verificou-se ainda que durante a demolha foram isoladas estirpes pertencentes aos grupos bacterianos formadores de trimetilamina (TMA) e bases azotadas voláteis (ABVT) como *Shewanella* spp. e *Morganella* spp., permitindo concluir que o processo de cura envolve actividade microbiana evidente, ainda que essa actividade possa, ou não, ter efeitos nas características organolépticas do produto final.

No bacalhau a TMA constitui a maior parte da ABVT até à deterioração. Observando os gráficos das figuras 3.14 e 3.15, constata-se que os teores de ABVT na Indústria **L** apresentam um teor de cerca de 20 mg N/100 g peixe ao longo do processo de preparação do bacalhau amarelo e, na indústria **R**, apesar de alguma oscilação, as amostras mantêm valores entre 30 e 39 mg N/100 g de peixe. Os níveis de ABVT mantêm-se elevados devido à formação de compostos azotados voláteis, como por exemplo NH₃. Isto é corroborado pelos resultados microbiológicos descritos na rubrica 3.2.1, que evidenciam uma significativa presença de microrganismos amonificantes no decurso do processo e especialmente na fase final.

3.3. Ensaio 3: Comparação entre o bacalhau de cura amarela e o bacalhau de cura branca

Este ensaio procurou comparar o bacalhau de cura branca e de cura amarela, avaliando indicadores microbiológicos, sensoriais, físico-químicas e nutricionais.

Em relação à cura amarela pretendeu-se ainda averiguar se uma cura suplementar de 3 meses do produto final (comercializável ao fim de cerca de 3 semanas de processamento), levaria ao aparecimento de diferenças significativas.

3.3.1. Indicadores microbiológicos

Os índices dos diferentes grupos microbianos funcionais, determinados em amostras dos diferentes produtos finais analisados, ou seja, de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela obtido ao fim de 3 semanas e bacalhau de cura amarela obtido ao fim de um prolongamento da cura de 3 meses, encontram-se no gráfico da Figura 3.16. Avaliou-se também o bacalhau salgado verde, por ser considerada a matéria-prima, a partir do qual os outros produtos foram preparados.

A análise global do gráfico patente na Figura 3.16 permite constatar que, relativamente às amostras de bacalhau salgado verde e de cura amarela, os perfis bacterianos não apresentam diferenças consideráveis em termos qualitativos em relação aos registados anteriormente, quer no ensaio 1, quer no ensaio 2. Esta constatação sugere que a microbiota deste tipo de matéria prima e de produto final é característica.

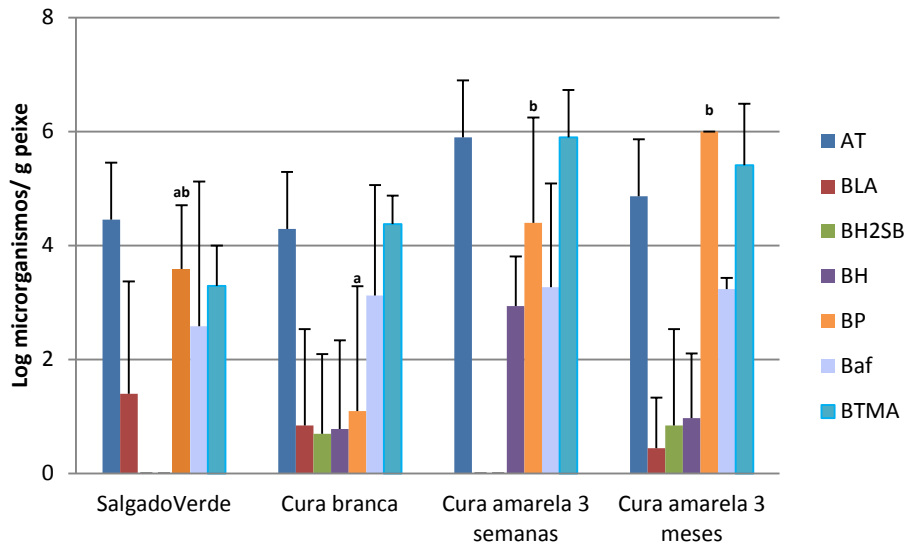


Figura 3.16 - Composição em termos de grupos bacterianos funcionais das amostras de bacalhau salgado verde, de cura branca, de cura amarela (produto final obtido ao fim de 3 semanas), e de cura amarela (produto final com maturação de 3 meses), em cru. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

Importa referir que os valores de desvio padrão são muito elevados reflectindo a dificuldade em quantificar a carga microbiana de sistemas tão complexos como estes.

Na Tabela 3.3. encontra-se patente o resumo da caracterização fenotípica das estirpes isoladas, por grupo funcional bacteriano, cuja análise permite notar a maior carga e diversidade bacteriana dos produtos de cura amarela

Tabela 3.3 - Caracterização fenotípica das estirpes isoladas segundo o processo de cura e grupo funcional.

| Produto analisado | Nº de estirpes seleccionadas/grupo funcional | Gram + | Catalase + | Oxidase + | com crescimento | | | | | | | Diluição origem |
|-------------------------------|--|--------|------------|-----------|-----------------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|--|
| | | | | | 15 °C | 30 °C | 37 °C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | |
| Salgado verde (n=7) | AT (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10 ⁻⁶ |
| | BP (n=3) | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ |
| | BTMA (n=3) | 0 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 10 ⁻⁴ |
| Cura branca (n=9) | B H ₂ S (n=2) | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 10 ⁻³ |
| | BH (n=2) | 1 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ |
| | MRS (n=1) | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10 ⁻³ |
| | BTMA (n=4) | 2 | 4 | 1 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 1 | 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ |
| Cura amarela 3 semanas (n=17) | AT (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10 ⁻⁶ |
| | BH (n=5) | 2 | 5 | 3 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 2 | 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ |
| | BP (n=3) | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 1 | 0 | 10 ⁻³ , 10 ⁻⁶ |
| | BTMA (n=6) | 2 | 6 | 1 | 6 | 6 | 4 | 6 | 6 | 3 | 2 | 10 ⁻⁶ |
| | Baf (n=2) | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 10 ⁻² |
| Cura amarela 3 meses (n=10) | B H ₂ S (n=2) | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 10 ⁻³ |
| | BH (n=3) | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 10 ⁻² , 10 ⁻³ |
| | BP (n=1) | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10 ⁻⁶ |
| | BTMA (n=4) | 1 | 4 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 2 | 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁶ |

Legenda: AT (aeróbios totais); BH (bactérias produtoras de histamina); BTMA (bactérias produtoras de trimetilamina); BH₂S (bactérias sulfito-redutoras/crescimento em Iron Agar); BP (bactérias proteolíticas);

A selecção das estirpes foi feita a partir das maiores diluições, de acordo com o aspecto das colónias. Assim, o facto do número de estirpes isoladas nas amostras de cura branca e de salgado verde ter sido menor, reflecte, além de uma menor carga microbiana, uma menor diversidade de tipos morfológicos nestes produtos.

O perfil dos grupos funcionais de bactérias espelha as características dos diferentes produtos analisados.

Na matéria prima foram detectados apenas 5 dos grupos estudados, resultado da acção inibidora do sal que apresenta no salgado verde uma concentração elevada, rondando os 19-20%, como já se havia confirmado nos ensaios 1 e 2.

Recorde-se que o processo de cura branca inclui uma fase de lavagem, que contribui para a remoção de parte do sal depositado nas zonas superficiais do peixe. Esta remoção promove a recuperação de grupos microbianos, cuja actividade se encontrava inibida pelo teor elevado de sal. Isto pode explicar que os grupos de bactérias sulfitorredutoras e produtoras de histamina se revelem neste produto, ao contrário do que acontece no salgado verde. Importa salientar que as bactérias associadas a estes grupos funcionais são reconhecidas como importantes agentes de alteração do peixe por diversos autores (Huss, 1995, Vogel *et al.*, 2005).

Por outro lado, e de acordo com os resultados patentes na tabela 3.3, constata-se que 60% das estirpes isoladas a partir do bacalhau de cura amarela com 3 meses, são capazes de se desenvolver em concentrações de 15% de NaCl, sendo que, apenas 11% das estirpes isoladas a partir da cura branca apresentam idêntica característica.

Acresce o facto de todas as estirpes de bactérias sulfitorredutoras e produtoras de histamina, isoladas a partir do bacalhau de cura amarela com 3 meses, apresentarem capacidade para crescer a 15% de NaCl. Isto sugere que, mesmo dentro de cada grupo funcional, a diversidade é extremamente elevada e que os microrganismos têm uma elevada capacidade de adaptação, o que permite que determinadas bactérias de alteração do peixe fresco continuem razoavelmente activas a concentrações de sal da ordem dos 10% (Klaveren e Legendre, 1965), e que mesmo inibidas por concentrações superiores, podem sobreviver e multiplicar-se quando as condições se tornam mais propícias.

Verifica-se que o grupo dos proteolíticos é significativamente superior nas amostras de bacalhau de cura amarela, quando comparadas com as amostras de bacalhau de cura branca e de salgado verde. Este facto permite inferir que as condições criadas pelo processo de cura amarela beneficiam este grupo, que pode eventualmente, ter um papel preponderante no desenvolvimentos de algumas características do produto final.

Note-se que, neste ensaio, contrariamente ao observado no ensaio 2, nenhuma das estirpes provenientes do grupo dos proteolíticos exibiu capacidade de crescimento a 15% de NaCl, reflectindo uma vez mais a diversidade ecológica dos microrganismos presentes neste tipo de produtos, mesmo dentro de um mesmo grupo funcional.

As bactérias produtoras de trimetilamina estão presentes em todos os produtos, exibindo teores superiores nos produtos de cura amarela, não representando contudo diferenças estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Sublinhe-se que a TMA é um dos compostos prevalentes no peixe alterado, bem como NH_3 e outras aminas voláteis, que contribuem para os teores elevados de ABVT (Huss, 1995), pelo que a presença de microrganismos produtores de trimetilamina e amonificantes, representam um contínuo e latente risco de deterioração do peixe.

Também neste ensaio 100% das estirpes isoladas (Tabela 3.3), revelaram capacidade para se desenvolver a temperaturas de 15 °C, enquanto apenas 53% apresentaram desenvolvimento a temperaturas de 37 °C, o que vai ao encontro do que foi constatado por Bjorkevoll *et al.* (2003). Estes autores efectuaram contagens bacterianas a partir de amostras de bacalhau, utilizando diferentes temperaturas de incubação (12, 20 e 37 °C) e os valores mais baixos foram obtidos a 37 °C

Saliente-se uma vez mais, que o habitat natural do bacalhau é caracterizado por temperaturas baixas, que limitam o desenvolvimento dos microrganismos que se desenvolvem melhor a temperaturas da ordem dos 37 °C. Esta pressão selectiva afecta a microbiota da matéria prima, reflectindo-se no processo de cura.

Praticamente 100% das estirpes isoladas revelou ser catalase positiva, em concordância com os resultados obtidos no ensaio 2, confirmando o que outros estudos já haviam demonstrado (Dyer, 1947; Dussault 1953), ou seja, que a microbiota do bacalhau é predominantemente aeróbia.

Verifica-se uma dominância de bactérias Gram – nos produtos finais (Tabela 3.3). Estes resultados são de alguma forma inesperados, pois as Gram – apresentam um

desenvolvimento limitado a valores de a_w inferiores a 0,93 (Huss e Valdimarsson, 1990) e as bactérias Gram + conseguem desenvolver-se a valores de a_w de 0,85, sendo que, os cocos Gram + são as bactérias que prevalecem em situações severas de tratamento como salga e secagem (ICMSF, 1988).

Contudo, esta dominância por parte das bactérias Gram - foi também constatada por Rodrigues *et al.* (2003). Os autores verificaram que, de 52 estirpes isoladas a partir de bacalhau salgado seco (correspondente à cura branca), 28 eram Gram -. Determinaram ainda a a_w no salgado verde e salgado seco e, tendo em conta os valores obtidos (0,73 e 0,70 respectivamente), reconheceram que muitas destas espécies detectadas não cresce, apenas sobrevive. Apontam ainda como provável fonte de contaminação a elevada manipulação durante o processo de salga e secagem.

Outra provável origem desta microbiota Gram - poderá ser a microbiota intestinal do bacalhau aquando da evisceração do peixe, porque a microbiota encontrada nas guelras e intestino dos peixes é constituída sobretudo por bactérias Gram - (Austin, 2006).

A análise dos resultados de PCR “fingerprinting” relativos às bactérias isoladas, Gram + e Gram -, conduziu aos dendrogramas das figuras 3.17 e 3.18. Seleccionaram-se estirpes para sequenciação, de forma semelhante à descrita no ensaio 2, em cada um dos clusters mais destacados. A identificação assim conseguida, até ao nível de género, encontra-se indicada nos dendrogramas das mesmas figuras. Foram analisadas por PCR “fingerprinting” 25 estirpes Gram - das quais 14 foram identificadas por sequenciação do 16S rDNA.

No dendrograma da Figura 3.17, destacam-se 2 “clusters” (B1 e B2), constituídos por estirpes com uma semelhança genotípica superior a 80%. As estirpes seleccionadas dentro destes grupos para sequenciação foram identificadas como pertencendo ao género *Alcaligenes*. Este género bacteriano foi isolado em diversos ambientes de processamento de peixe (Bagge-Ravn *et al.*, 2003), no “slime” do bacalhau fresco (Dyer, 1947) e congelado (Zaleski *et al.*, 1970) e nos intestinos e guelras de peixe (Austin, 2006), mas não foi detectado por Rodrigues *et al.*, (2003), num estudo sobre a microbiota do bacalhau salgado seco e demolhado.

Considerando que as estirpes identificadas como *Alcaligenes* spp. foram isoladas em amostras de bacalhau salgado verde, de bacalhau de cura branca e sobretudo em amostras de bacalhau de cura amarela, os resultados parecem revelar que estas bactérias, existindo

naturalmente no peixe aquando da captura, subsistem no bacalhau durante a salga, prevalecendo nas condições que lhe são propiciadas pela cura amarela ao invés da cura branca.

Alcaligenes spp. também está relacionado com a formação de reima em alguns queijos, sendo a sua ocorrência influenciada pelo pH, que deve ser inferior a 5, e otimizada pela temperatura ambiente de 20 °C (Davis e Babel, 1953).

As outras estirpes sequenciadas foram identificadas como pertencentes a *Psychrobacter* spp., *Shewanella* spp. e *Stenotrophomonas* spp.. Espécies destes últimos géneros bacterianos são referenciadas como detentoras de elevada capacidade para descarboxilar os aminoácidos ornitina e lisina respectivamente (López-Caballero *et al.* 2001, Hernández-Herrero *et al.*, 1999) e foram isolados por Rodrigues *et al.*, (2003), em bacalhau salgado seco e demolhado.

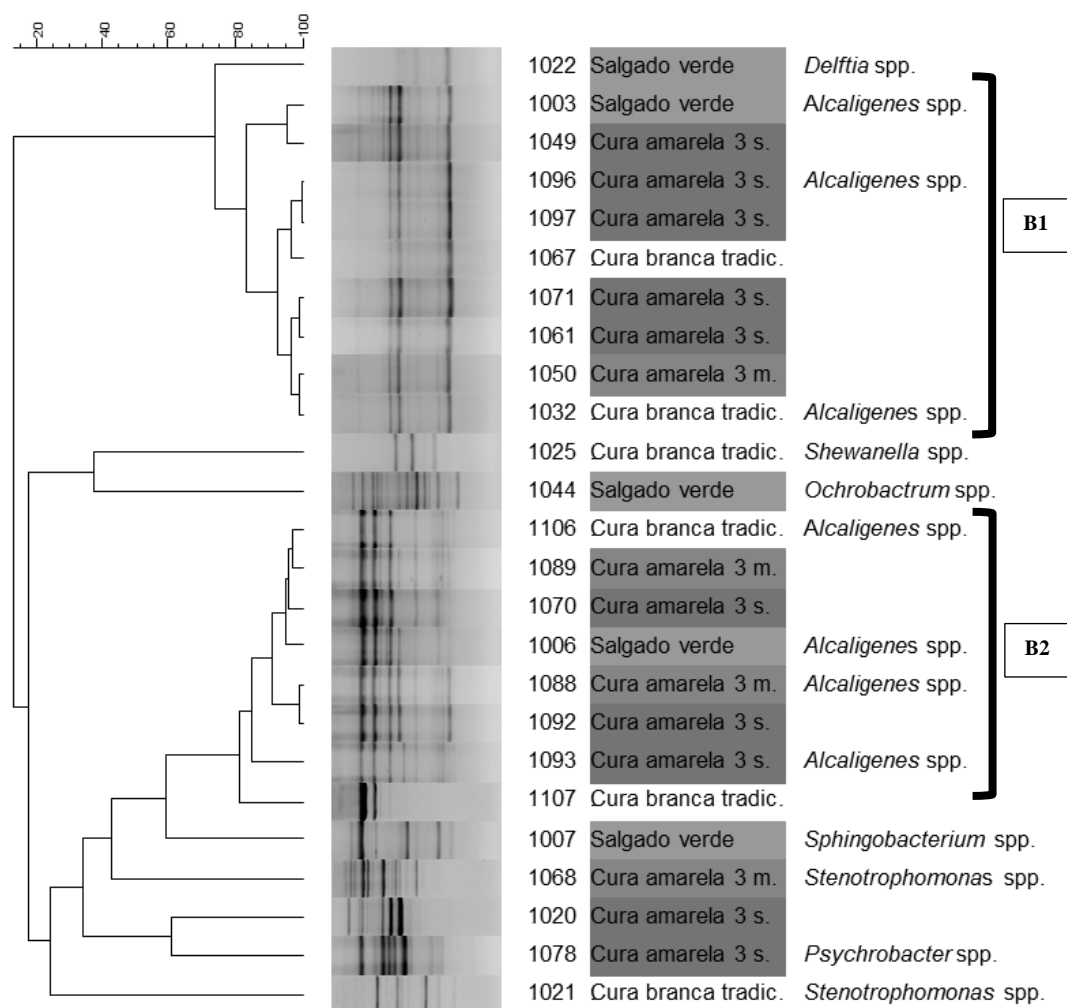


Figura 3.17 - Dendrograma baseado no PCR fingerprinting das estirpes Gram - isoladas a partir de amostras de bacalhau de cura branca tradicional, cura amarela 3 semanas, cura amarela 3 meses (a identificação até ao nível de género, indicada foi obtida pela sequenciação do gene 16S rDNA).

No presente estudo as estirpes destes géneros bacterianos foram isoladas tanto em amostras de bacalhau de cura branca, como de cura amarela, não sendo possível relacioná-los com um tipo de produto em particular.

O género *Stenotrophomonas* foi detectado também em bacalhau salgado verde por Rodrigues *et al.*, (2003), o que sugere que esta bactéria não é introduzida durante o processo, mas que também faz parte da microbiota natural do peixe.

A análise do dendrograma da figura 3.18, permite reconhecer 2 “clusters” (C1 e C2), com uma percentagem de semelhança entre as estirpes que os constituem, superior a 80%. Nestes dois “clusters” o género bacteriano dominante é *Staphylococcus*.

É importante sublinhar que este género bacteriano está associado à produção de histamina (Hernandez-Herrero *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2005), e que algumas espécies, como por exemplo *Staphylococcus auricularis* e *Staphylococcus warneri*, têm capacidade de produzir H₂S (Rodrigues *et al.*, 2003). Isto permite compreender o facto de ter sido detectado o grupo das bactérias sulfitorredutoras, no produto final de cura amarela, quando nos ensaios anteriores apenas se havia revelado nas fases de demolha.

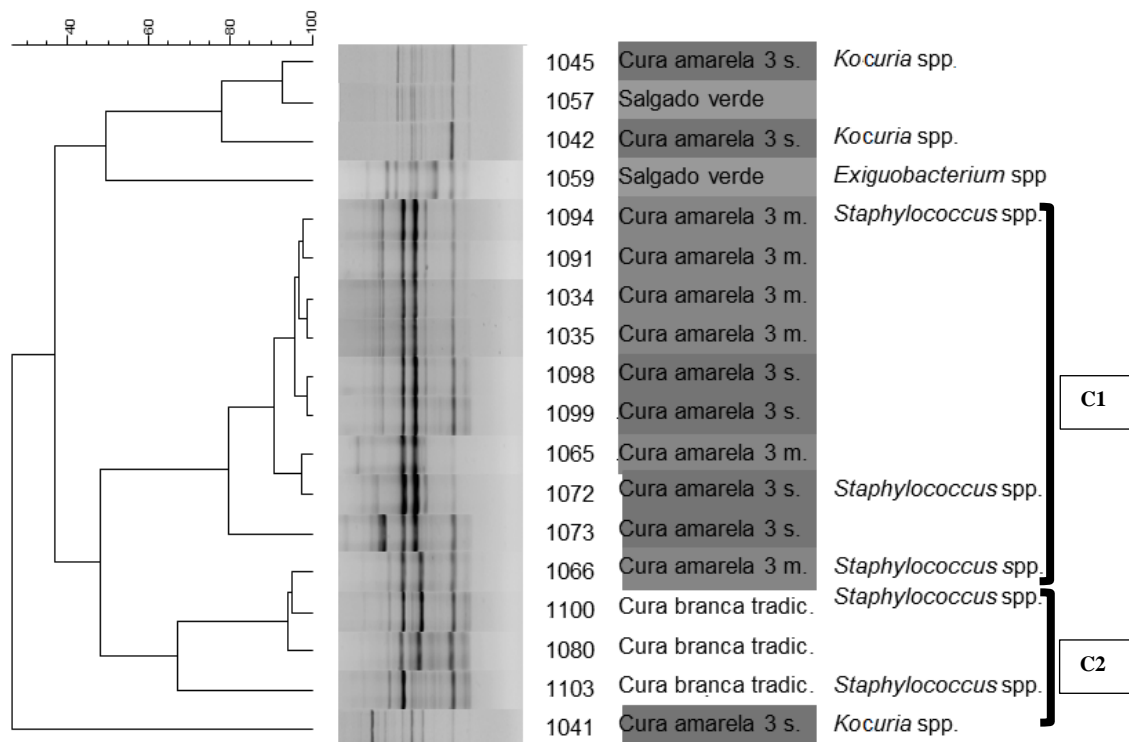


Figura 3.18 - Dendrograma baseado no PCR fingerprinting das estirpes Gram + isoladas a partir de amostras de bacalhau de cura branca, cura amarela 3 semanas, cura amarela 3 meses (a identificação até ao nível de género indicada foi obtida pela sequenciação do gene 16S rDNA).

De facto algumas estirpes de *Staphylococcus* spp, provenientes de amostras de cura amarela com três meses, incluídas nos citados “clusters”, foram isoladas a partir do meio para bactérias sulfitorredutoras (por exemplo as estirpes número 1034 e 1035) e do meio para produtores de histamina (por exemplo as estirpes número 1065 e 1066). Esta informação pode ser consultada com mais detalhe na Tabela 1 do Anexo II.

O esforço de amostragem aplicado permitiu uma boa discriminação, pois constatou-se não existirem diferenças assinaláveis, entre a identificação por sequenciação das estirpes seleccionadas e a conseguida por atribuição.

Calculou-se também o índice de Shannon Wiener e o índice de Simpson. O índice de Shannon revelou a existência de uma maior diversidade de grupos bacterianos Gram–, isolados no bacalhau salgado verde e no bacalhau de cura amarela com 3 meses de maturação. Contudo, é neste último produto que a diversidade apresentada pelas bactérias Gram + é mais baixa.

Toda esta análise está apresentada de forma mais detalhada no Anexo IV.

Relembre-se que o processo de selecção inicial das estirpes baseou-se na diferença de aspecto das colónias das bactérias, com crescimento nas maiores diluições, nos diferentes grupos funcionais bacterianos. Considerando este critério, foi a partir das amostras do bacalhau de cura branca, que se isolou menor número de estirpes, verificando-se agora que essas estirpes se distribuem por um maior número de grupos diferentes. Já em relação aos produtos de cura amarela o maior número de estirpes inicialmente isolado, correspondem a um menor número de grupos microbianos diferentes, sobretudo no que respeita às bactérias Gram +.

3.3.2. Indicadores físico-químicos

Os gráficos das Figuras 3.19, 3.20 e 3.21 apresentam os valores obtidos de humidade, sal, azoto básico volátil total (ABVT), azoto de trimetilamina (N-TMA) e azoto de aminoácidos livres (a.a. livres).

No que respeita às amostras de bacalhau de cura branca, os valores médios dos parâmetros físico-químicos estão conforme os que o produto acabado deve apresentar. Segundo a AIB (2010), estes deverão ser: teor de humidade $\leq 47\%$, teor de cloretos $\geq 20\%$, teor de ABVT ≤ 35 mg/100 g, teor de N-TMA ≤ 3 mg/100 g, de azoto de aminoácidos livres ≥ 95 e ≤ 120 mg/100 g e de proteína $\geq 26\%$.

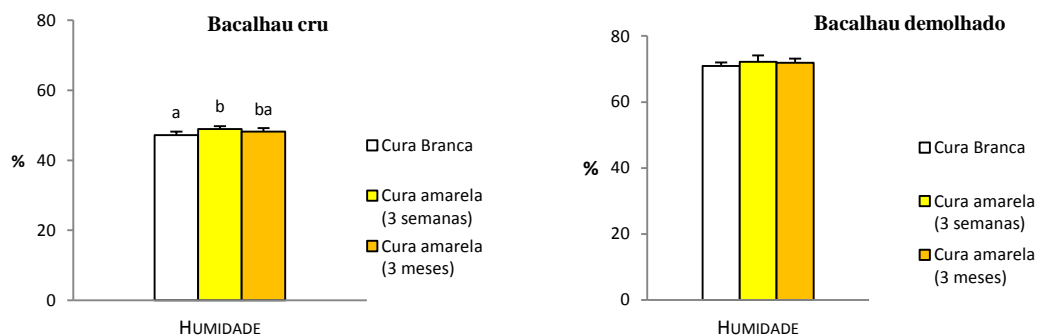


Figura 3.19 - Teor de humidade das amostras de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela e bacalhau de cura amarela com maturação de 3 meses, em cru⁸ e demolhado. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

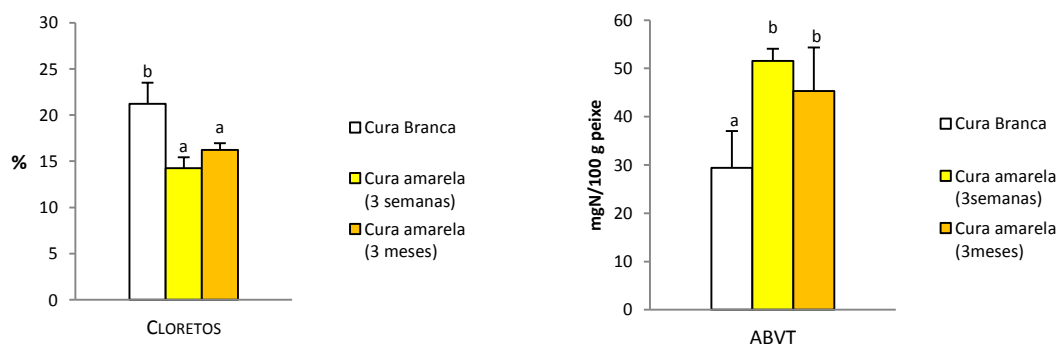


Figura 3.20- Teor em cloretos e ABVT das amostras de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela e bacalhau de cura amarela com maturação de 3 meses. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

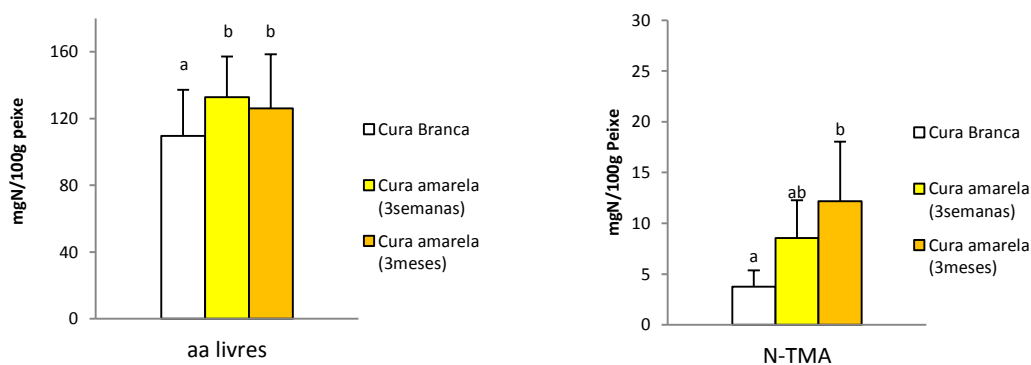


Figura 3.21 - Teor de N de aminoácidos livres (aa livres) e de N-TMA das amostras de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela e bacalhau de cura amarela com maturação de 3 meses. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

O produto final de cura amarela comercializado ao fim de 3 semanas apresenta uma humidade significativamente superior ($p < 0,05$) ao salgado seco, quando comparados em cru (Figura 3.19). Os valores obtidos são de 42-48% idênticos aos indicados na página da internet de uma empresa da Península de Gaspé que processa e comercializa bacalhau de cura amarela (www.gaspecured.com).

⁸ O termo cru é utilizado no sentido de produto curado mas não demolhado.

Todos os produtos demolhados apresentam valores mais elevados de humidade, de cerca de 71-72%, similares aos indicados por outros autores (Ferreira, 1953; Murray e Burt, 1969; INSA, 2006; Batista *et al.*, 2008; Gonçalves 2011).

No que respeita ao teor de sal (Figura 3.20), o bacalhau de cura branca (ou salgado seco), é o que apresenta um valor significativamente ($p < 0,05$) mais elevado (21.2%). Como o bacalhau de cura amarela é o que possui valores mais baixos de sal (cerca de 14% no produto final), o peixe fica mais susceptível a deterioração microbiana sobretudo devido à multiplicação de bactérias formadoras de reima, tal como é afirmado por Klaveren e Legendre (1965).

De acordo com as condições do ensaio os valores de ABVT, de aminoácidos livres e de N-TMA obtidos foram superiores no bacalhau de cura amarela (Figura 3.20 e 3.21), o que está em concordância com o indicado por Klaveren e Legendre (1965).

Elevados teores de N-TMA e ABVT podem ser indicadores de deterioração bacteriana (Veciana-Nogués *et al.*, 1997; Shewan, 1962). O prolongamento do tempo de cura parece não influenciar o teor de ABVT e aminoácidos livres, pois não há diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o produto final obtido ao fim de 3 semanas e o sujeito a uma cura suplementar de 3 meses. Deste modo parece não haver vantagem do ponto de vista microbiológico em prolongar a cura.

Como foi referido anteriormente (rubrica 3.3.1.), os produtos finais de cura amarela apresentaram um teor expressivo de microrganismos produtores de histamina. O sal em valores de 0,5% a 10% tem um efeito estimulante na formação de aminas biogénicas e só valores de 20% inibem a formação de amina pelas bactérias halotolerantes e halófilas (Hernandez-Herrero *et al.*, 1999).

Hernandez-Herrero *et al.*, (1999), determinaram elevadas concentrações de histamina num estudo levado a cabo em anchovas, devido sobretudo à actividade de *Staphylococcus* spp.. Este género microbiano correspondeu à identificação de 60% das estirpes bacterianas Gram +, por sequenciação de 16S rDNA. Por esta razão e apesar de no presente estudo o peixe analisado ser um peixe magro, não sendo normalmente associado a elevados teores de histamina, decidiu-se efectuar a determinação do valor de aminas biogénicas nestas amostras, especialmente de histamina, dada a sua importância enquanto agente alergénico.

Importa acrescentar que não foi possível efectuar esta determinação para todas as amostras, pois o seu elevado teor de sal colocava em risco a durabilidade da coluna do aparelho de HPLC. Esta situação obrigou a seleccionar as amostras que apresentaram os teores mais significativos de microrganismos produtores de histamina. Os resultados obtidos estão na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Teores de aminas biogénicas determinados em amostras de bacalhau de cura amarela, no produto final pronto para comercializar e no produto com mais tempo de maturação.

| Origem Fornecedor | Cura | Tiramina (mg/kg) | Putrescina (mg/kg) | Cadaverina (mg/kg) | Histamina (mg/kg) |
|----------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| L | Cura amarela 3 semanas | - | 5,6 | 58,2 | - |
| L | Cura amarela 3 semanas | - | 12,9 | 107,6 | 6,8 |
| R | Cura amarela 3 semanas | - | 4,5 | 7,3 | - |
| R | Cura amarela 3 semanas | - | 6 | 4,5 | - |
| L | Cura amarela 3 meses | 13,1 | 18,8 | 254 | 15,7 |
| R | Cura amarela 3 meses | - | 3,5 | 20,4 | - |

O valor de histamina presente nas amostras analisadas não é significativo, nem problemático à luz da legislação actual, que estabelece como valor limite 400 mg/kg, para produtos de pesca submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura (Regulamento CE N°1441/2007), o que parece evidenciar que, independentemente da presença de microrganismos com capacidade de produzir histamina, não se reúnem condições favoráveis a essa formação.

Constata-se que nas amostras provenientes do fornecedor **L**, os teores de cadaverina são superiores às amostras do fornecedor **R**. Tendo em conta que a origem e tamanho do peixe e a metodologia seguida pelos 2 fornecedores foram semelhantes, a ilação que se pode retirar é que a qualidade original da matéria prima, ou seja, do bacalhau salgado verde é diferente.

Para uma completa comparação entre o bacalhau de cura branca e o bacalhau de cura amarela foram determinados os teores de gordura, proteína e cinza. Esta determinação foi feita em amostras de bacalhau cru e demolhado e os resultados encontram-se nos gráficos das Figuras 3.22, 3.23 e 3.24.

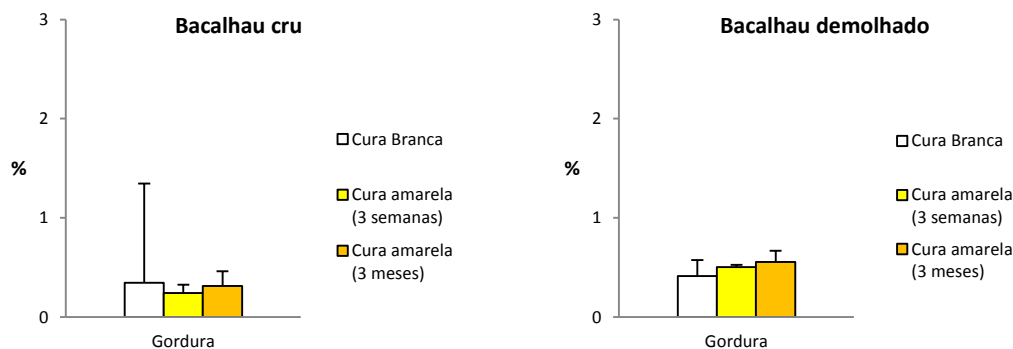


Figura 3.22 - Teor de gordura das amostras de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela e bacalhau de cura amarela com maturação de 3 meses, em cru⁹ e demolhado.

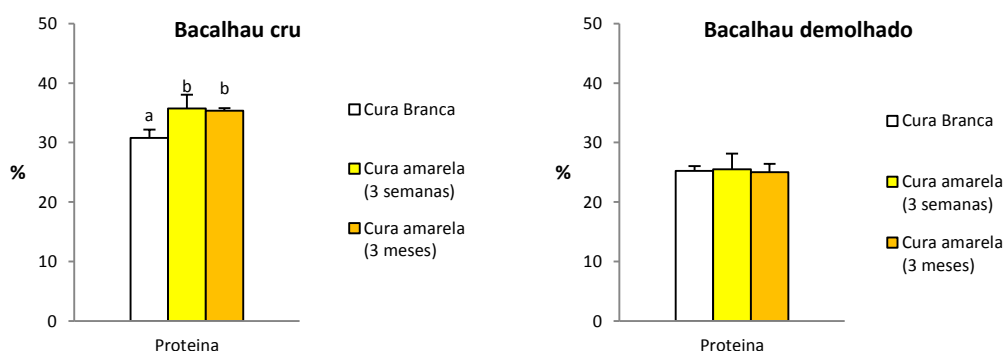


Figura 3.23 - Teor de proteína das amostras de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela e bacalhau de cura amarela com maturação de 3 meses, em cru e demolhado. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

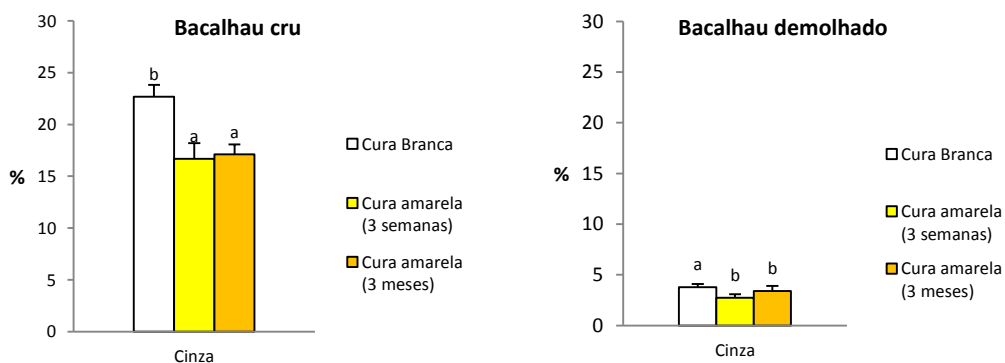


Figura 3.24 - Teor de cinza das amostras de bacalhau de cura branca, bacalhau de cura amarela e bacalhau de cura amarela com maturação de 3 meses, em cru e demolhado. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

O teor de proteína do bacalhau de cura amarela em cru é significativamente superior ($p < 0,05$) ao de cura branca, apresentando valores de 35,3-35,7%, (Figura 3.23), próximos dos indicados pela empresa da Península de Gaspé anteriormente referida (www.gaspeured.com).

⁹ Termo „cru“ utilizado no sentido de curado não demolhado

Como afirma Botelho (1965b), neste tipo de produto, a proteína é mais elevada e concentrada em consequência de maior desidratação. Esta desidratação referida parece ser conseguida pela eliminação de sal, durante a demolha, removendo simultaneamente água que possa estar ligada aos cristais de sal, e pelas prensagens, que antecedem cada secagem.

Os valores médios de proteína diminuem com a demolha. Quando o bacalhau é demolhado o valor da proteína diminui como resultado do aumento significativo ($p < 0,05$) do teor de humidade, que reduz desta forma o valor percentual da proteína. Todavia, nas amostras demolhadas não foram detectadas diferenças significativas entre os produtos de diferentes curas.

Os valores determinados são idênticos aos de outros autores que indicam valores de proteína de 29,1% no bacalhau salgado seco (Gonçalves, 2011) e 19% -22% no bacalhau demolhado (INSA, 2006; Gonçalves, 2011).

Na presente análise o conteúdo em gordura é muito baixo em todos os produtos (Figura 3.22), quer em cru, quer demolhados, não apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre eles. Os valores encontrados foram similares aos referidos por outros autores (Gonçalves Ferreira 1953; Murray e Burt 1969; INSA, 2006; Batista *et al.*, 2008; Gonçalves 2011; www.gaspecured.com).

Em relação à cinza (Figura 3.24), as amostras de peixe de cura amarela revelaram valores médios de 15% e as de cura branca, valores da ordem de 23%. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) detectada é justificada pela remoção de parte do sal aquando da fase de demolha, que caracteriza o início do processo de cura amarela. Os produtos analisados após demolha apresentam valores médios de cinza inferiores aos produtos em cru, o que está em concordância com diversos autores (INSA, 2006; Gonçalves, 2011).

Os teores de Mg, K, Na obtidos nos produtos demolhados encontram-se na Tabela 3.5. No que concerne ao Mg não existem diferenças significativas entre os produtos de cura amarela “3 semanas”, cura amarela “3 meses” e cura branca.

Tabela 3.5 - Valores médios de Mg, K e Na do bacalhau de cura branca, do bacalhau de cura amarela com 3 semanas e do bacalhau de cura amarela com 3 meses de maturação. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

| | Mg (mg/kg peixe) | K (mg/kg peixe) | Na (g/kg peixe) |
|--------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| Cura branca | 141,0 ± 27,3 | 457,0 ± 52,1 ^c | 21,6 ± 6,8 ^b |
| Cura amarela (3 semanas) | 117,4 ± 23,1 | 205,5 ± 27,8 ^a | 15,5 ± 9,3 ^a |
| Cura amarela (3 meses) | 109,7 ± 24,4 | 295,7 ± 53,2 ^b | 15,5 ± 4,4 ^{ab} |

Relativamente ao K, existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os produtos provenientes das diferentes curas. Os níveis encontrados na cura branca foram em média 457 mg/kg de peixe, significativamente superiores aos 205 mg /kg apresentados pelos produtos de cura amarela. Para o bacalhau de cura amarela a empresa da Península de Gaspé indica valores de K de 710 mg/kg peixe (www.gaspecured.com). De acordo com INSA (2006) o bacalhau salgado seco demolhado contém uma média de 360 mg de K por kg de peixe. Gonçalves (2011) constatou uma elevada dispersão na concentração de K entre 100 e 450 mg/kg no bacalhau demolhado explicado pelas grandes variações do teor de potássio dentro das mesmas espécies.

Em relação ao Na, as concentrações são muito superiores às determinadas em relação aos Mg e K. No bacalhau de cura branca (salgado seco) os níveis são significativamente superiores ($p < 0,05$), quando comparados com o bacalhau de cura amarela. Os valores indicados na bibliografia são em geral, mais baixos: cerca de 5600 mg/kg no bacalhau de cura amarela (www.gaspecured.com) e 5525 mg/kg no bacalhau salgado seco demolhado (INSA, 2006; Gonçalves, 2011). Estas discrepâncias podem ser explicadas pelas diferenças na forma e tempo de demolha, pela grande diversidade geral apresentada pelo bacalhau e diferente composição das amostras. Por exemplo, se as amostras analisadas apresentam mais espinha(s) os valores obtidos serão forçosamente diferentes.

Com base na fórmula descrita pela FAO (1989), determinou-se ao valor energético do bacalhau de cura branca e de cura amarela (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Média e desvio padrão dos valores energéticos do bacalhau de cura branca, do bacalhau de cura amarela com 3 semanas e do bacalhau de cura amarela com 3 meses de maturação, em cru (ou seja curado não demolhado) e demolhado.

| | Valor Energético (kcal) | |
|-------------------------|-------------------------|--------------|
| | Cru | Demolhado |
| Cura branca | 126,2 ± 4,7 | 104,7 ± 3,5 |
| Cura amarela (3semanas) | 145,1 ± 9,6 | 106,6 ± 10,6 |
| Cura amarela (3meses) | 144,1 ± 1,6 | 105,1 ± 5,4 |

Verificou-se que o valor energético do bacalhau de cura amarela em cru é superior ao do bacalhau de cura branca. Com a demolha, devido à diminuição em termos percentuais do valor da proteína, o valor energético diminuiu e a diferença entre os dois tipos de cura atenuou-se, como era expectável.

3.3.3. Indicadores sensoriais

DETERMINAÇÃO DA COR

Relativamente à quantificação da cor, baseada nos parâmetros L^* , a^* , b^* determinados quantitativamente com recurso ao Macbeth Color -Eye 300, os resultados estão patentes na Figura 3.25.

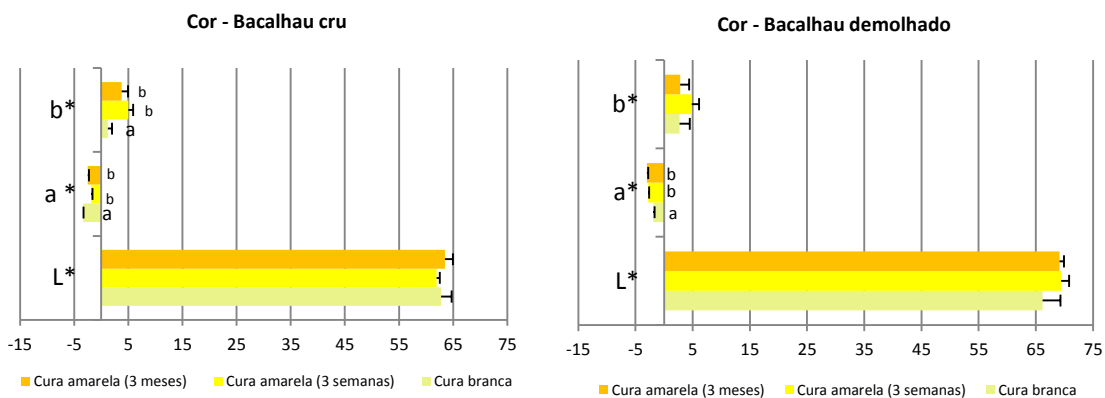


Figura 3.25 - Comparação dos parâmetros L^* , a^* , b^* apresentados por amostras de bacalhau de cura branca, de cura amarela (produto final obtido ao fim de 3 semanas), e de cura amarela (produto final com maturação de 3 meses), em cru e demolhadas. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

Entre os peixes de cura amarela e de cura branca não existem diferenças significativas em relação ao parâmetro L^* , (intensidade luminosa) mesmo quando as amostras são demolhadas. Verifica-se que a cura suplementar de 3 meses não influenciou significativamente este mesmo parâmetro.

Apesar de um ligeiro aumento de L^* que ocorreu com a demolha esta intensificação não tem significado estatístico. Este aumento apresentado pelo peixe de cura branca contraria outro estudo sobre bacalhau salgado seco (Gonçalves, 2011), em que foi detectado uma diminuição do valor de L^* resultando num escurecimento do peixe. Esta diferença pode, no entanto, ser justificada pela heterogeneidade das amostras utilizadas, que se reflecte inclusive no desvio padrão associado ao valor de L^* , no caso do bacalhau de cura branca demolhado.

Relativamente aos valores de a^* e b^* existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os produtos provenientes dos dois diferentes tipos de cura. No caso particular do parâmetro a^* esta diferença significativa permanece nas amostras demolhadas. Quanto aos valores de b^* esta diferença é explicada pela evidente cor amarela característica do bacalhau do tipo de cura amarela.

Os valores de croma e brancura foram calculados (de acordo com fórmulas indicadas em 2.3.4.) e encontram-se indicados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Comparação dos parâmetros croma e brancura apresentados por amostras de bacalhau de cura branca, de cura amarela 3 semanas e de cura amarela com 3 meses de maturação, em cru e demolhado. As letras diferentes junto aos valores médios indicam que existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p < 0,05$).

| | Croma | | Brancura | |
|--------------------------|-----------|-------------------------|------------|------------|
| | demolhado | cru | demolhado | cru |
| Cura branca | 3,4 ± 1,4 | 3,6 ± 0,3 ^a | 66,0 ± 2,9 | 62,6 ± 1,9 |
| Cura amarela (3 semanas) | 5,6 ± 1,1 | 5,4 ± 0,7 ^b | 68,9 ± 1,2 | 61,6 ± 0,6 |
| Cura amarela (3 meses) | 4,2 ± 1,0 | 4,6 ± 0,9 ^{ab} | 68,9 ± 0,8 | 63,2 ± 1,4 |

Os peixes de cura branca apresentam valores de croma mais baixos sendo que, as diferenças dos valores de croma são significativas quando se comparam peixes dos diferentes tipos de cura em cru. Após a demolha, não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes amostras, em relação aos parâmetros de cor determinados.

ANÁLISE SENSORIAL

No que respeita à avaliação sensorial realizada pelo painel de provadores, verificou-se que apenas os atributos analisados no peixe cru revelaram diferenças significativas, para

permitir distinguir os peixes de cura amarela, dos peixes de cura branca (Figuras 3.26 a 3.27). Depois de cozidas as amostras de bacalhau não apresentaram diferenciação. As diferenças de cor observadas (Figura 3.26), haviam sido também detectadas pela quantificação da cor, usando o colorímetro.

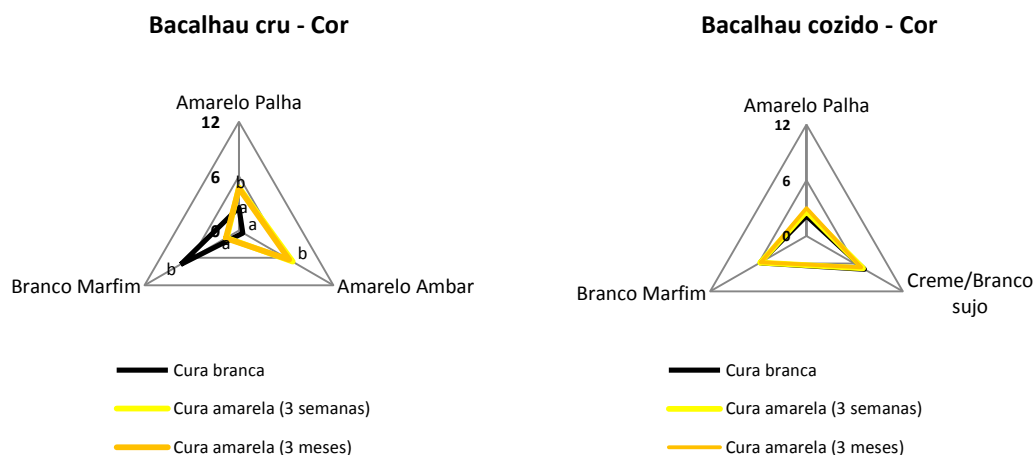


Figura 3.26 - Avaliação dos atributos relacionados com a cor das amostras de bacalhau de cura branca, de cura amarela (produto final obtido ao fim de 3 semanas), e de cura amarela (produto final com cura suplementar de 3 meses), em cru e em cozido. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

Existem diferenças significativas em relação aos atributos amarelo âmbar e branco marfim, sendo que, as amostras de bacalhau de cura amarela apresentam valores significativamente superiores ($p < 0,05$) em relação ao primeiro.

Esta diferenciação esbate-se completamente com o processo de confecção (demolha e cozedura).

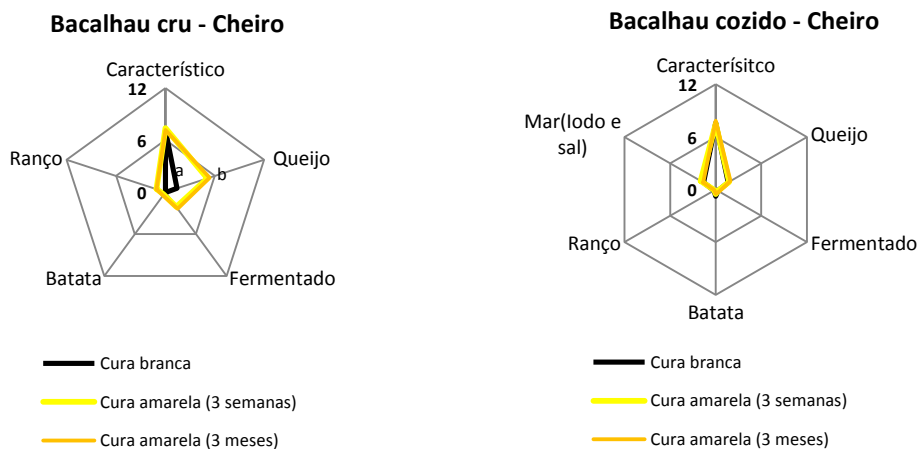


Figura 3.27 - Avaliação dos atributos relacionados com o cheiro das amostras de bacalhau de cura branca, de cura amarela (produto final obtido ao fim de 3 semanas), e de cura amarela (produto final com cura suplementar de 3 meses), em cru e em cozido. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

O cheiro a queijo e a cor âmbar são os atributos mais importantes para diferenciar a cura amarela da cura branca, apresentando valores significativamente mais elevados na primeira ($p < 0,05$).

A análise dos resultados sugere que o cheiro a fermentado é um atributo que não está muito consolidado no painel. Os valores detectados foram no caso da cura branca $0,07 \pm 0,08$, para a cura amarela 3 semanas $2,13 \pm 1,76$ e para a cura amarela 3 meses $2,41 \pm 1,89$. Para além de não ter sido muito detectado apresentou um elevado desvio padrão, o que parece reflectir que um dos provadores é mais sensível a este atributo.

O cheiro a batata e ranço não foram considerados relevantes pelo painel, apresentando pontuações médias inferiores a 1.

No que concerne ao aspecto, para além do atributo cor, já abordado em particular, a análise revelou diferenças significativas relativamente ao brilho e translucência (Figura 3.28). Em relação a estes atributos, os produtos de cura amarela exibiram pontuações significativamente ($p < 0,05$) mais elevados.

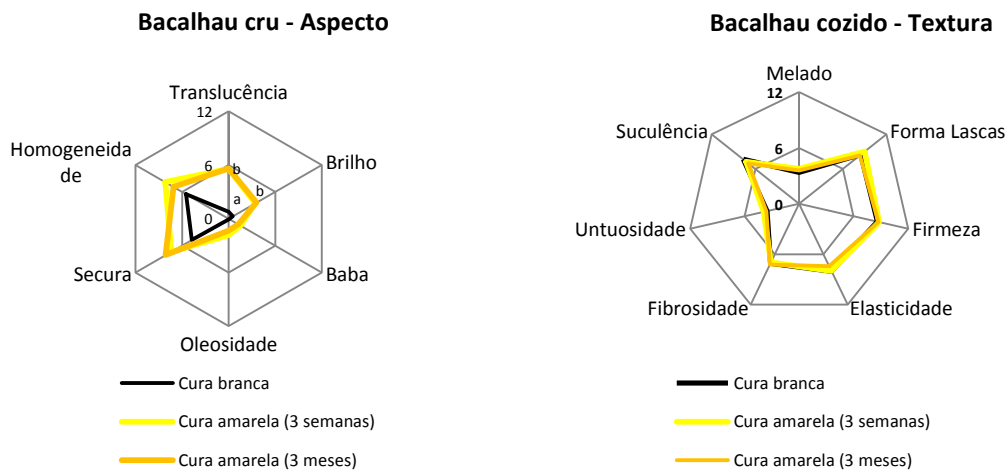


Figura 3.28 - Avaliação dos atributos relacionados com o aspecto das amostras de bacalhau de cura branca, de cura amarela (produto final obtido ao fim de 3 semanas), e de cura amarela (produto final com cura suplementar de 3 meses), em cru e em cozido. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$); “Baba”, termo que consta da folha de prova, idêntico a reima-.

Quanto aos atributos relacionados com a categoria sabor, o painel de provadores pontuou de forma semelhante as diferentes amostras, pelo que não foram considerados descritores significativos (Figura 3.29). O sabor a ranço e a fermentado não se apresentaram relevantes para os elementos do painel.

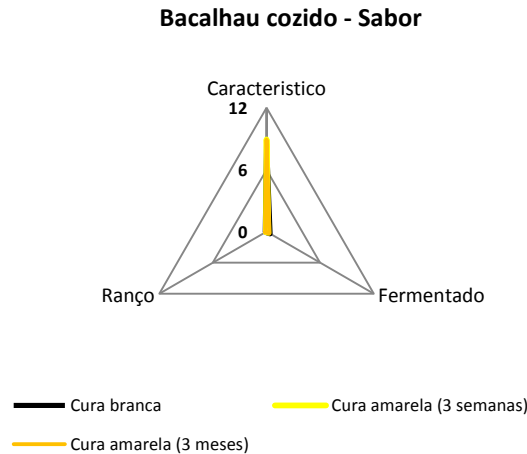


Figura 3.29- Avaliação dos atributos relacionados com o sabor das amostras de bacalhau de cura branca, de cura amarela (produto final obtido ao fim de 3 semanas), e de cura amarela (produto final com cura suplementar de 3 meses), em cozido.

Comparando as amostras de bacalhau de cura amarela de 3 semanas com as amostras sujeitas a uma cura suplementar de 3 meses, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas, o que pressupõe que, o prolongamento do tempo de cura, não altera significativamente as características sensoriais, pelo menos nas condições do ensaio.

3.4. Ensaio 4: Biodiversidade microbiana do bacalhau de cura branca e de cura amarela com base no método de sequenciação múltipla paralela de DNA

A partir de amostras de bacalhau de cura branca, de bacalhau de cura amarela, considerado pronto ao fim de 3 semanas, e de bacalhau de cura amarela sujeito a uma cura final prolongada por 3 meses, extraiu-se o DNA microbiano e procedeu-se a pirosequenciação.

Note-se que esta metodologia é baseada no DNA microbiano total extraído das amostras de bacalhau, pelo que os resultados traduzem não só a presença das células microbianas viáveis, mas também DNA de microrganismos não cultiváveis e não viáveis. A abordagem por pirosequenciação permitiu construir o dendrograma patente na Figura 3.30. e fazer uma caracterização global da microbiota do bacalhau.

Foram identificadas menos de 100 UTO (unidades taxonómicas operacionais): 16 para o bacalhau de cura branca (a partir de 7831 sequências), 31 para o bacalhau de cura amarela (a partir 16485 sequências) e 41 para o bacalhau de cura amarela com 3 meses

de maturação (a partir de 5748 sequências). No entanto, esta metodologia não permitiu fazer uma boa identificação de 247 UTO (2 a partir da amostra de cura branca, 3 a partir da amostra de cura amarela com 3 semanas e as restantes da amostra de cura amarela com 3 meses), permitindo apenas considerá-las no grupo das bactérias.

Os principais géneros identificados foram, *Staphylococcus* e *Psychrobacter*. Nas amostras de bacalhau de cura amarela, especialmente no preparado com 3 meses de cura, a diversidade de microrganismos foi maior do que no bacalhau de cura branca e foram detectadas espécies como *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. e *Arthrobacter* spp., reconhecidas pela sua actividade de alteração no bacalhau (Rodrigues *et al.*, 2003).

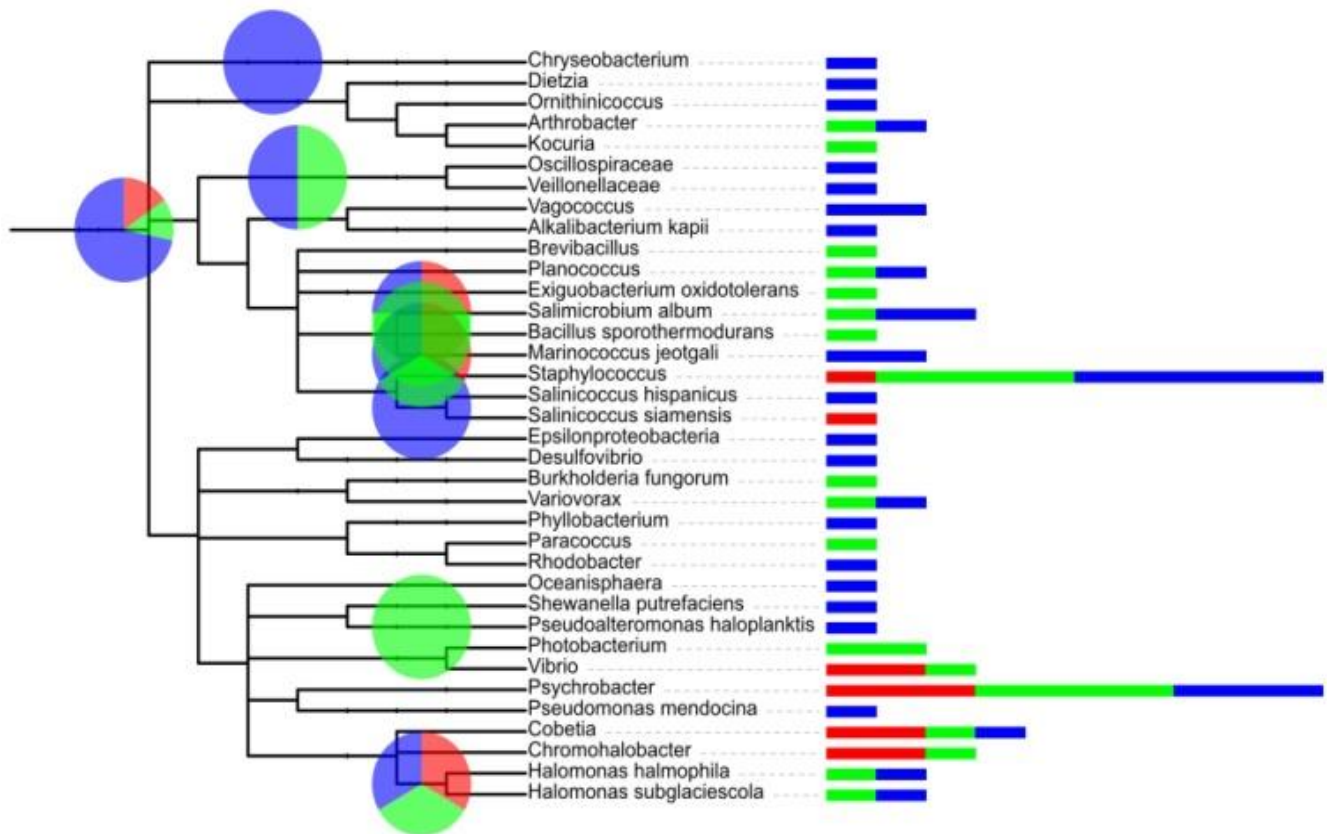


Figura 3.30 - Dendrograma filogenético com os grupos taxonómicos identificados nas amostras analisadas. As barras correspondem ao número de UTO determinadas Os círculos representam a distribuição de UTO dos mais elevados “rankings” vermelho (bacalhau cura branca), verde (bacalhau cura amarela 3 semanas), azul (bacalhau cura amarela 3 meses de maturação).

Constata-se que muitas das bactérias detectadas pela metodologia de pirosequenciação são mencionadas em diversos estudos sobre a microbiologia do peixe: *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Chrysobacterium* (*Flavobacterium*) spp. foram isoladas na pele ou no “slime” de bacalhau fresco, recém-capturado e armazenado em gelo (Dyer, 1947; Zaleski *et al.*, 1970), bem como no músculo de bacalhau fresco e fumado (Tarr, 1939); *Bacillus* spp., *Alkalibacterium kapii* em peixe salgado e produtos fermentados à base de peixe provenientes do Japão e Tailândia (Ishikawa *et al.*, 2009); *Photobacterium* spp., *Vibrio* spp. e *Shewanella* spp. em diversos peixes e produtos de pesca (Cahill, 1990), sendo apontados como tendo um papel relevante na deterioração destes produtos (Shewan, 1962; Debevere e Boskou, 1996; Gram e Huss, 1996; López-Caballero, 2001; Skjerdal *et al.*, 2004); *Vagococcus* spp. foi isolado em truta (González *et al.*, 2000).

Outros géneros detectados nas amostras analisadas, encontram-se citados na bibliografia e estão relacionados sobretudo com ambientes de elevada concentração de sal, como salinas ou lagos salgados. Foi o caso das bactérias Gram -, *Halomonas* spp. e *Cobetia* spp. (Lee *et al.*, 2005), e da Gram variável *Salimicrobium* spp. (Yoon *et al.*, 2009), esta detectada sobretudo no produto de cura branca, que apresenta maior teor de sal.

A bactéria Gram - *Phyllobacterium* spp. foi isolada em raízes de cana de açúcar (Lambert *et al.*, 1990), a *Variovorax* spp. no solo, (Im *et al.*, 2010), bem como as bactérias Gram + *Brevibacillus* spp. e *Ornithinococcus* spp. (Baek *et al.*, 2006; Groth *et al.*, 2001). *Proteobacterium* spp. foi isolado em sedimentos marinhos (Urakawa *et al.*, 1999). *Parococcus* spp. (Okeke *et al.*, 2002) é uma bactéria desnitrificante tolerante ao sal e o género *Planococcus* caracteriza-se por apresentar colónias pigmentadas de laranja e ser Gram + (Suresh *et al.*, 2007).

Rhodobacter spp. é um género com uma grande diversidade metabólica incluindo fotossíntese, litotrofia, respiração aeróbia e anaeróbia, o que lhe permite sobreviver em variados meios. Este género é comum em todos os tipos de meio aquático (Puskas *et al.*, 1997; Glaeser e Klug, 2005).

O género *Vibrio* foi encontrado em amostras de bacalhau de cura branca e cura amarela. Este género inclui espécies patogénicas, o que torna a indicação da sua presença alvo de especial atenção. Rodrigues *et al.* (2003), isolaram uma estirpe da espécie *Vibrio alginolyticus*, em amostras de bacalhau demolido, relacionando-a com a deterioração do peixe, sobretudo a temperaturas de armazenamento superiores à temperatura de refrigeração. Esta espécie bacteriana é apontada como capaz de produzir elevados teores

de histamina num período de tempo curto, sobretudo se o peixe for deixado a temperaturas elevadas (Karovicova e Kohajdová, 2005).

Sendo um género bacteriano presente no ambiente de diversas indústrias de processamento de peixe, nomeadamente de preparação de caviar e salmão fumado (Bagge-Ravn *et al.*, 2003), não é contudo, relevante na maior parte dos estudos sobre a microbiota do bacalhau salgado (Boury, 1932; Dussault, 1953; Vilhelmsson *et al.*, 1996; Bjorkevoll *et al.*, 2003).

Efectuou-se a comparação entre os resultados obtidos pelas duas abordagens de identificação dos microrganismos do bacalhau (Figuras 3.31 e 3.32), isto é, utilizando a pirosequenciação do DNA total presente na amostra e a sequenciação do 16S rDNA das estirpes isoladas.

A pirosequenciação permitiu detectar um número superior de diferentes géneros microbianos, quer em relação às bactérias Gram +, quer em relação às bactérias Gram -.

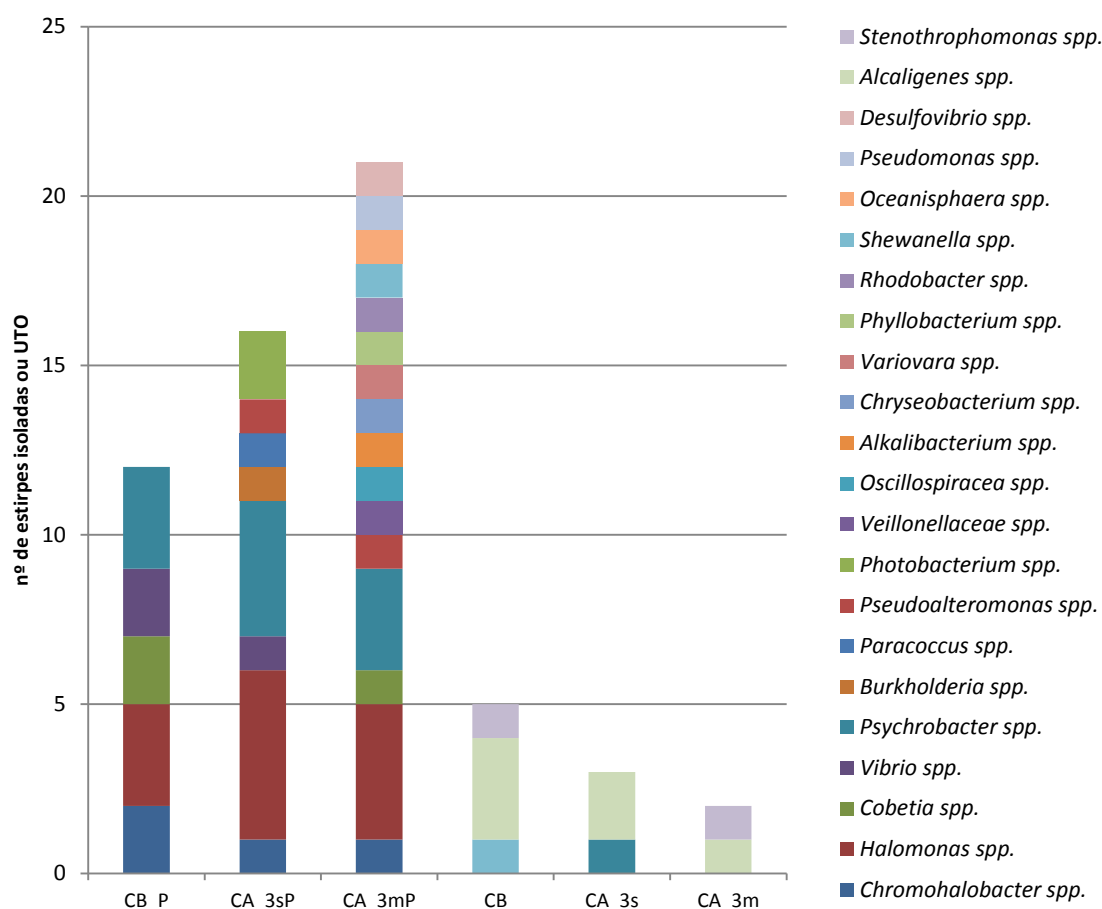


Figura 3.31 - Gráfico comparativo dos grupos taxonómicos identificados nas diferentes amostras analisadas pelo método de pirosequenciação do DNA total e pela sequenciação 16S rDNA de estirpes Gram - isoladas. Amostras de bacalhau cura branca CB, bacalhau cura amarela 3 semanas CA_3s, bacalhau cura amarela 3 meses de maturação CA_3m, "P" indica que a metodologia foi pirosequenciação.

A detecção por pirosequenciação do género *Vibrio* spp. (Figura 3.31), parece dever-se à subsistência de DNA de células inviáveis no bacalhau, dado que nenhuma das estirpes isoladas, a partir das amostras dos diferentes produtos, foi identificada como pertencente a *Vibrio* spp.. Este género é comumente encontrado nas guelras e no aparelho digestivo de peixes do mar (Austin, 2006), e foi identificada a espécie *Vibrio alginolyticus* em bacalhau demolhado (Rodrigues *et al.*, 2003). Deste modo tudo indica ser o sal o factor que destrói, ou inibe a multiplicação desta bactéria no bacalhau sujeito a salga e secagem. Foram isoladas e identificadas sete estirpes de *Alcaligenes* spp. e duas de *Stenotrophomonas* spp. (Figura. 3.17, rubrica 3.3.1.). Contudo, estes géneros não foram detectados pela metodologia de pirosequenciação. Tendo em conta que não foi possível proceder a uma identificação de 247 UTO, é possível que algumas destas UTO correspondessem a estas espécies bacterianas.

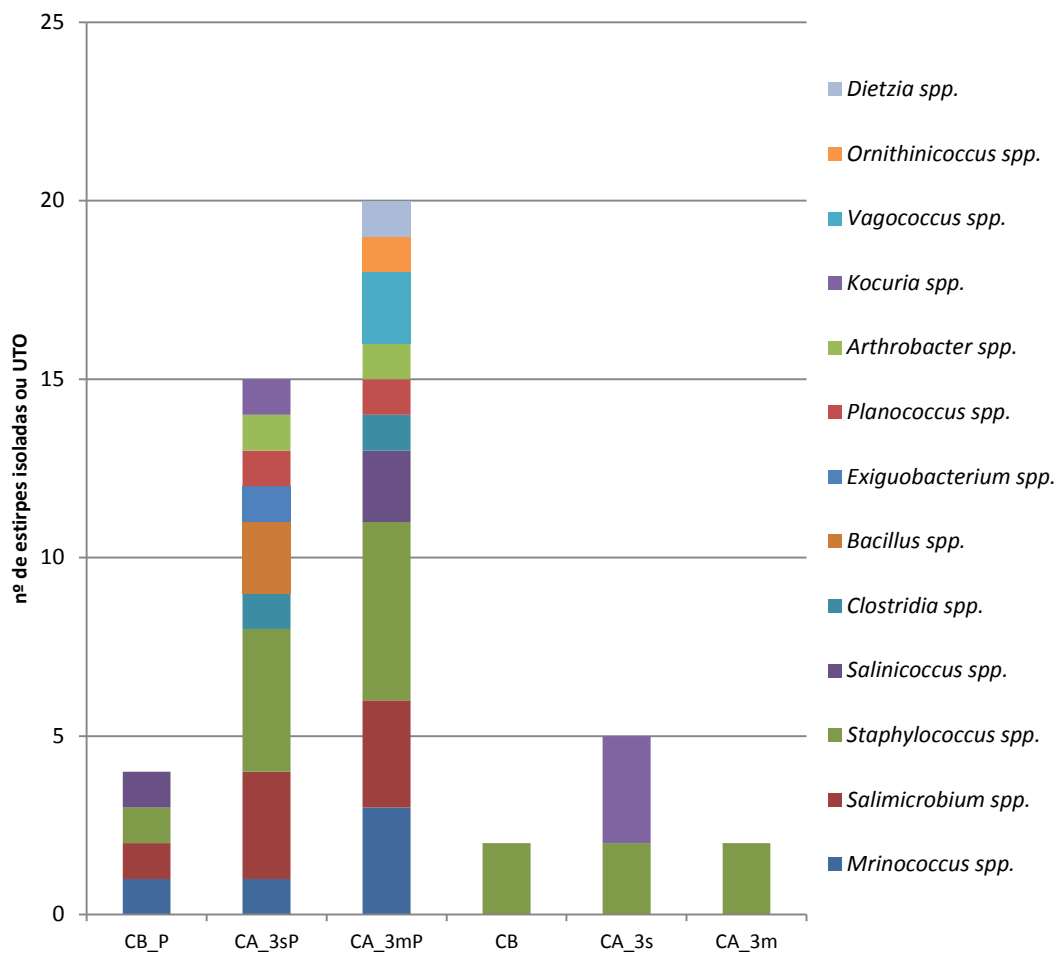


Figura 3.32 - Gráfico comparativo dos grupos taxonómicos identificados nas diferentes amostras analisadas pelo método de pirosequenciação do DNA total e pela sequenciação 16S rDNA de estirpes Gram + isoladas. Amostras de bacalhau cura branca CB, bacalhau cura amarela 3 semanas CA_3s, bacalhau cura amarela 3 meses de maturação CA_3m; “P” indica que a metodologia foi pirosequenciação.

Apesar do género *Psychrobacter* spp. ter sido detectado em todas as amostras analisadas por pirosequenciação, por sequenciação do gene 16S rDNA apenas foram identificadas estirpes na cura amarela de 3 semanas. Porém, recordando os resultados do Ensaio 2 (rubrica 3.2.1), constatou-se que esta bactéria Gram – foi isolada nas fases de demolha e secagem subsequente, durante o processo de preparação do bacalhau de cura amarela. Por outro lado é sabido que esta bactéria encontra-se presente na pele do bacalhau recém-capturado, e que é halotolerante, isto é, desenvolve-se bem a 3,5% de NaCl, tem um crescimento lento a 10%, não cresce mas sobrevive a 15% e a 25% de NaCl (Bjorkevoll *et al.*, 2003). Tudo indica tratar-se de um microrganismo capaz de sobreviver à salga do bacalhau mas que requer condições específicas para se desenvolver, particularmente no que respeita ao teor de água e de sal do alimento. Considerando este pressuposto, compreende-se que esta bactéria seja detectada por pirosequenciação do DNA presente nas amostras de bacalhau, reflectindo assim, a presença das células que subsistem, independentemente do processo de salga. Também se compreende que apenas tenham sido isoladas estirpes nas amostras de bacalhau de cura amarela 3 semanas, pois são as que contêm em média, o teor de humidade mais elevado (48,9%) e de sal mais baixo (14,3%), condições que lhe são mais favoráveis (Figura 3.19 e 3.20). O género *Psychrobacter* é reconhecido como dominante no bacalhau salgado e salgado seco demolido, estando associado ao cheiro desagradável a mofo, que por vezes se liberta (Bjorkevoll *et al.*, 2003).

No que concerne às bactérias Gram +, verifica-se que o género bacteriano *Staphylococcus* é o mais relevante, prevalecendo em todas as amostras analisadas, por uma e outra metodologia (Figura 3.32).

3.5. Ensaio 5: Estudo da estabilidade do produto de cura amarela

3.5.1. Indicadores microbiológicos

Neste ensaio pretendeu-se tipificar a dinâmica das populações dos principais grupos funcionais estudados ao longo do processo de cura e estabelecer indicadores microbiológicos da interface conservação/alteração, que fossem úteis para controlar o processo a nível industrial.

Constata-se que as fases de 2ª secagem e produto final (correspondendo no presente estudo à 3ª secagem) são caracterizadas por um teor elevado de microrganismos

proteolíticos, amonificantes e produtores de trimetilamina (Figura 3.33). Com o início da putrefacção ocorre um significativo decréscimo do teor dos grupos das bactérias proteolíticas e amonificantes situação que se mantém no estado de putrefacção. De facto as amostras de bacalhau, considerado em início de putrefacção e putrefacção, caracterizaram-se pela existência de reima superficial e aromas desagradáveis não apresentando contudo, decomposição do tecido muscular. Isto indicia que a proteólise não foi levada a um grau extremo o que implicaria a desintegração dos tecidos.

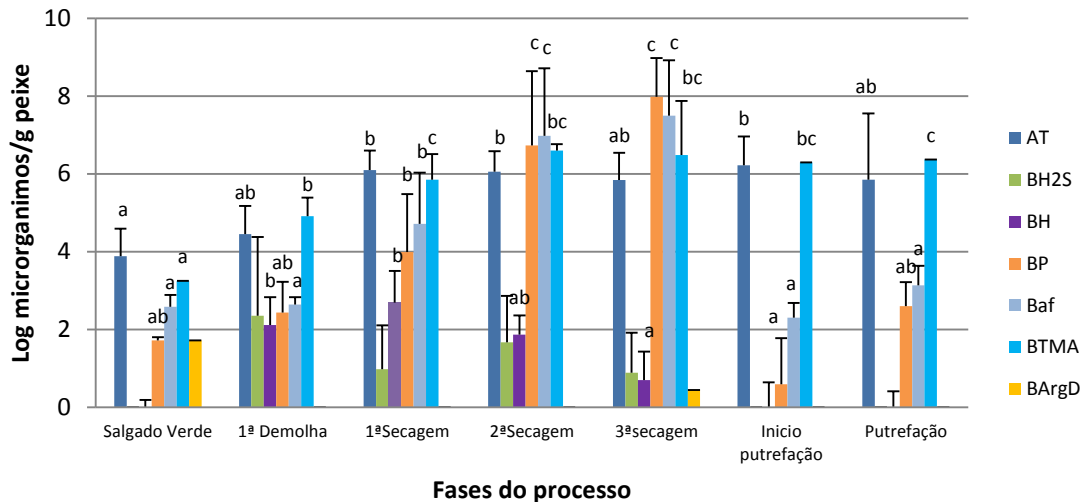


Figura 3.33 - Evolução dos diferentes grupos bacterianos funcionais ao longo do processo de cura: AT (aeróbios totais); BH (bactérias produtoras de histamina); BTMA (bactérias produtoras de trimetilamina); B H2S (bactérias sulfito-redutoras/crescimento em Iron Agar); BP (bactérias proteolíticas); B ArgD (bactérias descarboxiladoras de L-arginina) As letras diferentes junto aos valores médios de um dado grupo funcional indicam diferenças estatisticamente significativas entre as fases ($p < 0,05$).

Outro aspecto a salientar e que pode concorrer para explicar esta diminuição do teor de microrganismos, é a dificuldade em separar os microrganismos da matriz polisacáridica que constitui a reima, facto que pode dificultar a quantificação dos microrganismos na presença desta substância.

O grupo dos produtores de trimetilamina atinge os valores máximos na fase de 2ª secagem, mantendo-se sem alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) até à putrefacção.

Constata-se que a variedade de grupos funcionais é maior nas fases iniciais do processo, sobretudo demolha e primeiras secagens, sendo que, do conjunto inicial de grupos, apenas prevalecem os proteolíticos, amonificantes e produtores de trimetilamina.

Observa-se também valores elevados de desvio padrão que traduzem, uma vez mais, a elevada diversidade das amostras, apesar do esforço em colher amostras de peixe da mesma origem, peso e tamanho.

Na Tabela 3.8 encontram-se patentes algumas das características apresentadas pelas estirpes isoladas. O maior número de estirpes isoladas provém da fase de 1ª secagem, sendo provenientes de diferentes grupos funcionais, o que, tendo em conta a metodologia de selecção, reflecte a dinâmica da população microbiana ao longo a produção do bacalhau de cura amarela até à fase de putrefacção.

Ao longo do processo, desde o estado salgado verde até ao produto final de cura amarela, 21% das estirpes isoladas é Gram + e 18% consegue desenvolver-se num meio com 15% de NaCl. Estas percentagens aumentam no produto alterado (início de putrefacção e estado de putrefacção), em que 87% das estirpes é Gram + e 67% apresenta crescimento em meio com 15% de NaCl.

Durante a fase de demolha, do processo de preparação do bacalhau, apenas 16% das estirpes é Gram +. A predominância de estirpes Gram – na demolha do bacalhau já havia sido reconhecida por Pedro *et al.*, (2002) e constatada no trabalho desenvolvido por Rodrigues *et al.*, (2003).

Tabela 3.8 - Caracterização fenotípica das estirpes isoladas segundo a fase do processo e grupo funcional.

| Fase de preparação do peixe | Nº de estirpes seleccionadas/ grupo funcional | Gram + | Catalase+ | Oxidase+ | com crescimento | | | | Diluição | | | | |
|---------------------------------------|--|--------|-----------|----------|-----------------|-------|-------|---------|----------|---------|----------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | | | | 15 °C | 30 °C | 37 °C | NaCl 0% | | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | |
| Salgado Verde (n=4) | AT (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻⁴ | |
| | BP (n=1) | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 ⁻² | |
| | BDArg (n=1) | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻² | |
| | BTMA (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 ⁻⁴ | |
| 1ª Demolha (n=6) | B H ₂ S (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | BH (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻² | |
| | BP (n=2) | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | BTMA (n=1) | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻⁵ | |
| 1ª Secagem (n=14) | AT (n=2) | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 10 ⁻⁵ | |
| | B H ₂ S (n=1) | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10 ⁻² | |
| | BH (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 10 ⁻³ | |
| | BP (n=3) | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ | |
| | Baf (n=3) | 0 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 1 | 10 ⁻² | |
| 2ª Secagem (n=7) | BTMA (n=3) | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 10 ⁻⁶ | |
| | AT (n=2) | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 10 ⁻⁶ |
| | B H ₂ S (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 10 ⁻³ | |
| | BP (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 10 ⁻⁵ ,10 ⁻⁶ | |
| 3ª Secagem /produto final (n=8) | BTMA (n=2) | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 10 ⁻⁵ ,10 ⁻⁶ | |
| | AT (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 10 ⁻⁵ ,10 ⁻⁶ | |
| | B H ₂ S (n=3) | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 10 ⁻² | |
| Início putrefacção (n=8) | BP (n=1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10 ⁻⁶ | |
| | BTMA (n=2) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 10 ⁻⁵ | |
| | AT (n=2) | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 10 ⁻⁵ |
| | BP (n=3) | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 10 ⁻² |
| Putrefacção (n=7) | BDArg (n=1) | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻² | |
| | BTMA (n=2) | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 ⁻⁷ | |
| | AT (n=3) | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 10 ⁻⁵ ,10 ⁻⁷ |
| | BP (n=3) | 2 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 10 ⁻² ,10 ⁻³ |
| | BTMA (n=1) | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 10 ⁻⁶ | |

Legenda: AT (aeróbios totais); BH (bactérias produtoras de histamina); BTMA (bactérias produtoras de trimetilamina); BH₂S (bactérias sulfito-redutoras/crescimento em Iron Agar); BP (bactérias proteolíticas); BDArg (bactérias descarboxiladoras de arginina).

Em relação às bactérias Gram – isoladas e sequenciadas, os géneros *Alcaligenes* e *Psychrobacter* foram os predominantes (90%). O primeiro em fases de secagem e o segundo em todas as fases analisadas, incluindo a demolha (Figura 3.34), o que se justifica dado que o género *Psychrobacter* é halotolerante (Bozal *et al.*, 2003).

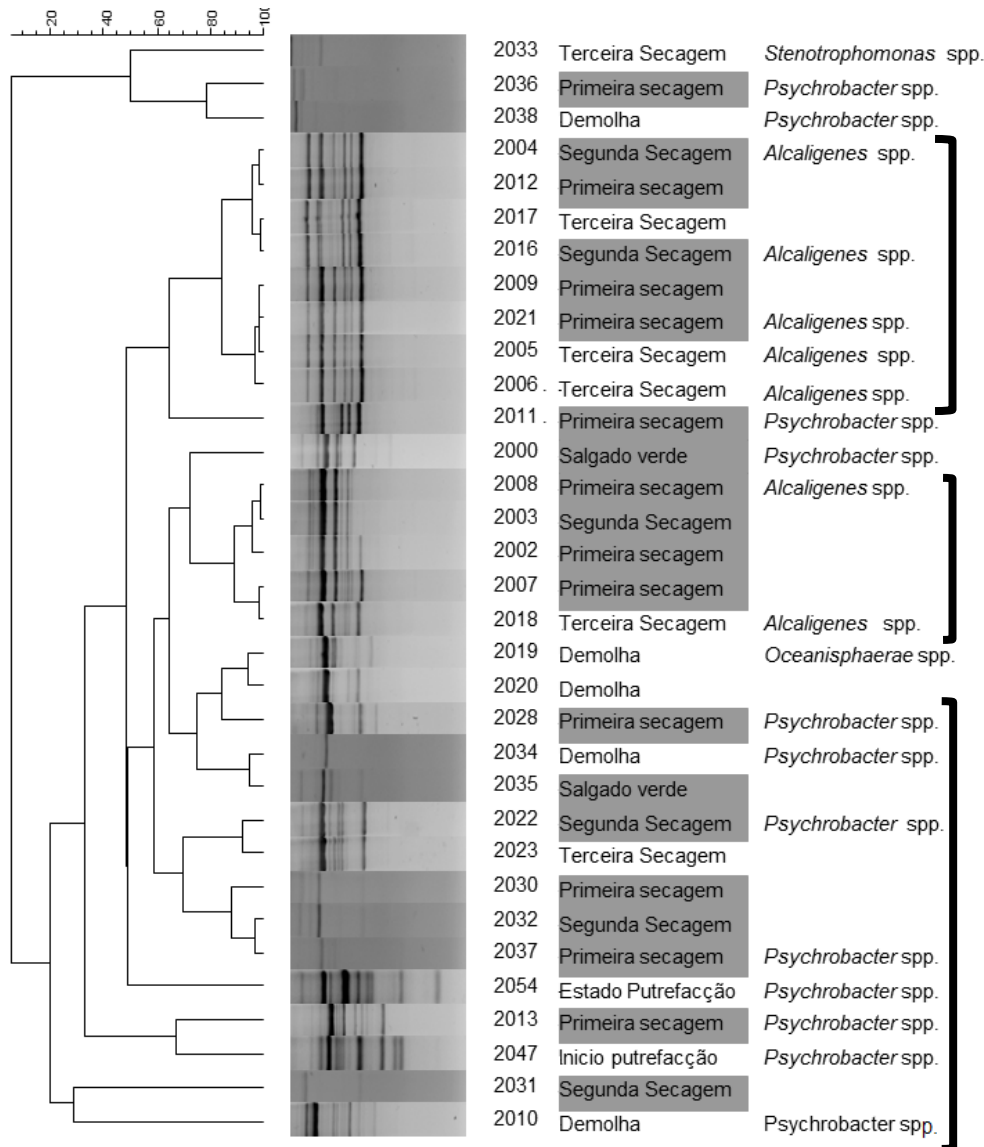


Figura 3.34 - Dendrograma baseado no PCR fingerprinting das estirpes Gram - isoladas a partir das diferentes fases de elaboração do bacalhau de cura amarela.

Em geral, os membros do género *Psychrobacter* apresentam actividade lipolítica e são capazes de hidrolisar os aminoácidos leucina (Mejlholm *et al.*, 2005). Segundo Garcia-Lopez e Maradona (2000) não estão associados à produção de TMA, pelo menos em elevadas quantidades. De facto, existem pelo menos duas espécies, *Psychrobacter cibarius* e *Psychrobacter maritimus*, que demonstraram ligeira produção de TMA durante o armazenamento a 4 °C. No entanto, a quantidade produzida foi considerada

muito baixa em comparação com a produzida pelas bactérias *Photobacterium phosphoreum* e *Shewanella putrefaciens*. Esta ligeira produção de TMA por *Psychrobacter* spp. pode, contudo, explicar o odor desagradável que se liberta no peixe deteriorado (Mejlholm *et al* 2005), como já foi referido anteriormente.

Quando comparada a identificação obtida por sequenciação do gene 16S rDNA, com a resultante da atribuição baseada na percentagem de semelhança determinada pela análise do PCR fingerprinting, verificou-se que não existe diferença considerável. A determinação do índice de Shanon, permitiu verificar que a diversidade das bactérias Gram – isoladas nas fases de salgado verde é elevada, diminui com a demolha e volta a aumentar nas fases de secagem. Em relação às Gram + a diversidade é muito elevada em todas as fases onde foi isolada mais de uma estirpe, excepto na fase de putrefacção em que o índice é nulo (Anexo IV).

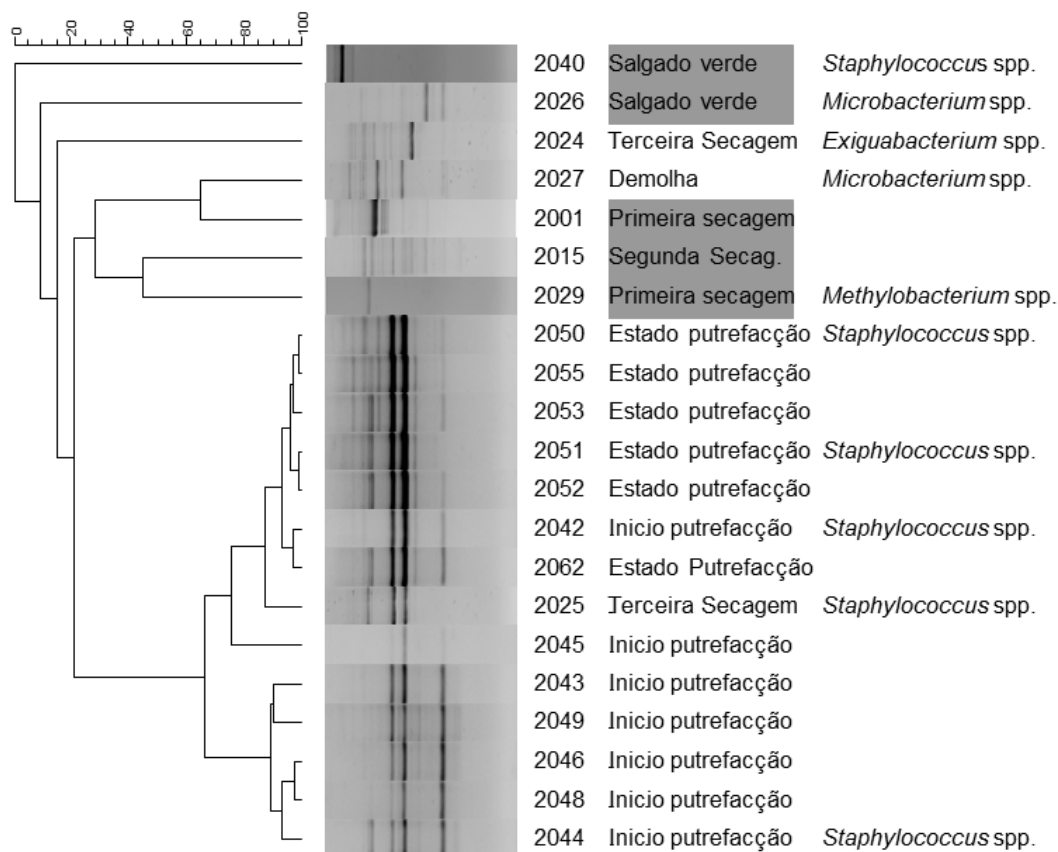


Figura 3.35 - Dendrograma baseado no PCR fingerprinting das estirpes Gram + isoladas a partir das diferentes fases de elaboração do bacalhau de cura amarela.

Das estirpes Gram + sequenciadas (Figura 3.35), 60% foram identificadas como pertencendo a *Staphylococcus* spp..

Este facto parece indiciar que as bactérias do género *Staphylococcus* desempenham um papel decisivo na maturação do bacalhau de cura amarela. Algumas estirpes deste género já são utilizadas como culturas de arranque na cura de produtos cárnicos, pela sua reconhecida actividade proteolítica, da qual resultam elevados teores de azoto não proteico (Bover-Cid *et al.*, 2001). Tendo em conta os resultados obtidos, a pesquisa de bactérias Gram + (ou do género *Staphylococcus*) poderá ser um indicador especialmente útil para controlar o processo de cura amarela a nível industrial, principalmente se for desenvolvido um meio de cultura que torne a pesquisa rápida e expedita.

3.5.2. Indicadores físico-químicos

Paralelamente ao estudo da evolução e caracterização da microbiota do peixe ao longo do processo de preparação do bacalhau de cura amarela, efectuou-se o estudo das características físico-químicas.

A evolução da humidade e dos cloretos ao longo do processo e nas fases de putrefacção encontra-se patente nos gráficos das Figuras 3.36 e 3.37.

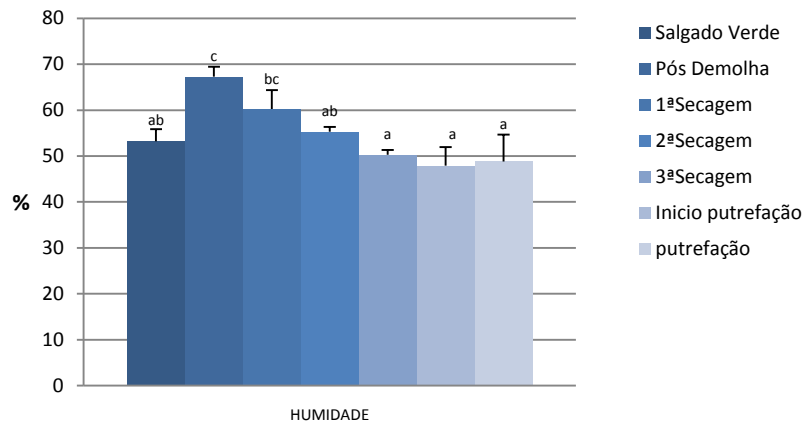


Figura 3.36 - Evolução da humidade ao longo do processo de cura e putrefacção do produto. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

O teor de humidade atinge o valor máximo aquando da demolha, diminuindo de forma significativa ($p < 0,05$) nas fases subsequentes de secagem e mantendo-se depois com valores médios inferiores a 50% durante a putrefacção.

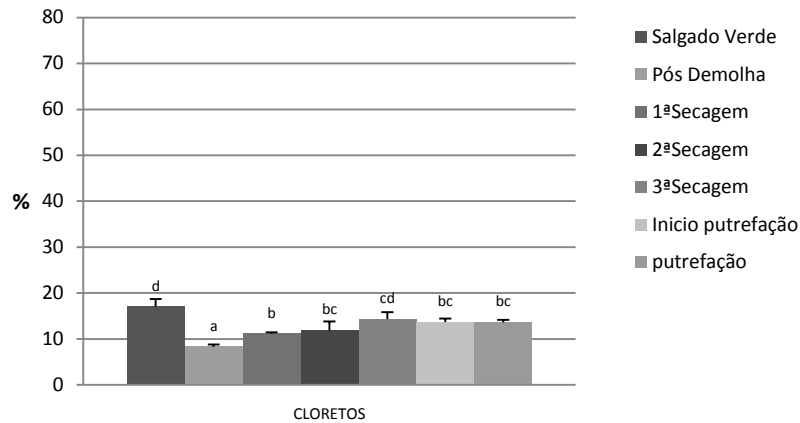


Figura 3.37 - Evolução do teor de cloretos ao longo do processo de cura e putrefacção do produto. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

O teor de cloretos é significativamente reduzido com a demolha atingindo um valor inferior a 10%, ocorrendo aumentos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) com as fases de secagem, não havendo alteração no decorrer da putrefacção do produto. Esta tendência já havia sido observada nos ensaios 1, 2 e 3.

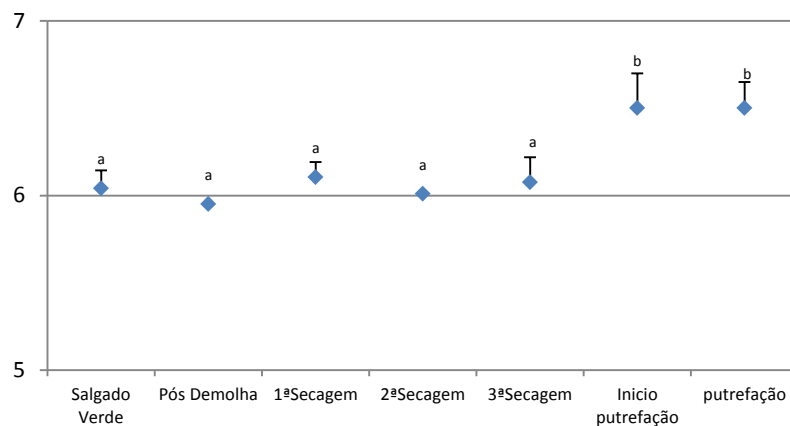


Figura 3.38 - Evolução do pH ao longo do processo de cura e putrefacção do produto. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

O pH ao longo do processamento do bacalhau de cura amarela ronda o valor médio de 6, até ao produto final comercializável (Figura 3.38). Quando inicia a putrefacção verifica-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Botelho (1965a) também verificou que a formação de reima era acompanhada pelo aumento de pH.

Este aumento do pH é acompanhado por um incremento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do teor de ABVT, N-TMA e azoto aminoácidos livres (Figuras. 3.39, 3.40 e 3.41). O teor de ABVT continua a aumentar devido, como referido anteriormente, à formação de vários compostos azotados, incluindo NH_3 .

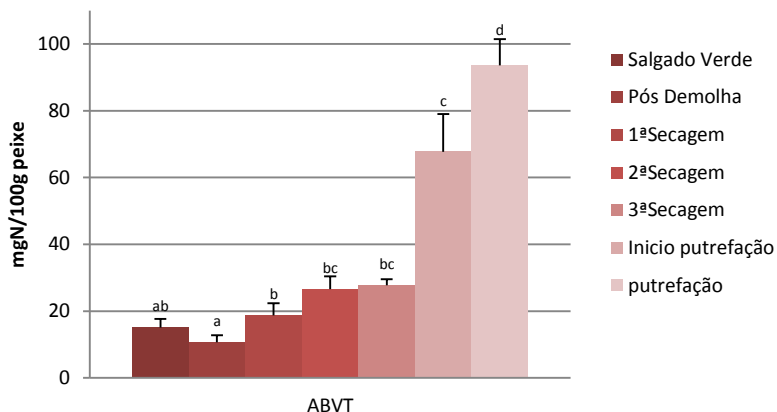


Figura 3.39 - Evolução do teor de azoto básico volátil ao longo do processo de cura e putrefacção do produto. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

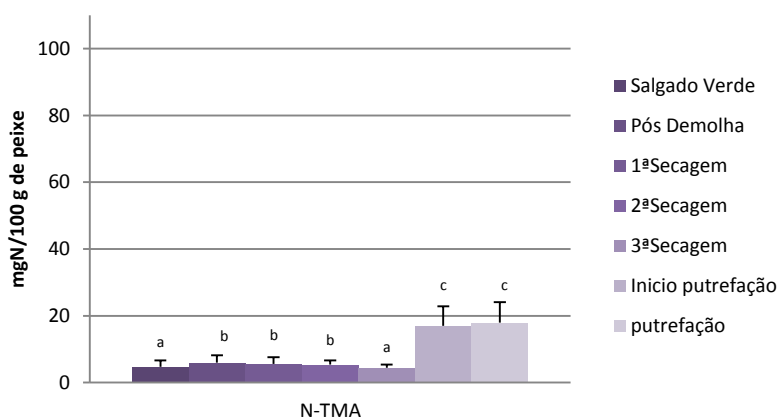


Figura 3.40 - Evolução de N-TMA ao longo do processo de cura e putrefacção do produto. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

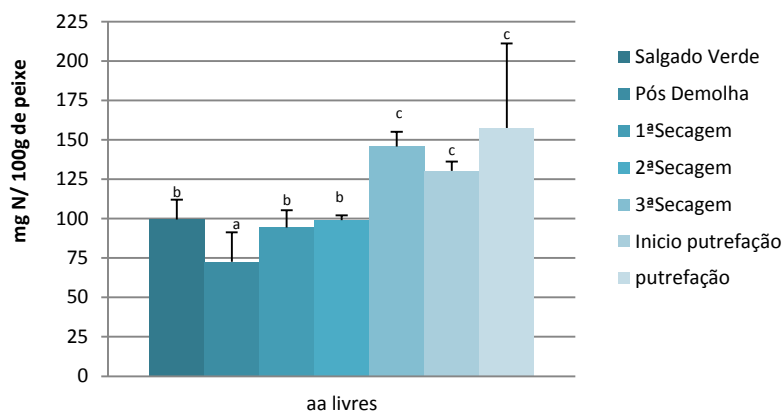


Figura 3.41 - Evolução do teor de azoto dos aminoácidos livres ao longo do processo de cura e putrefacção do produto. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

Fazendo a ponte com a dinâmica dos grupos funcionais bacterianos, ao longo das fases estudadas neste ensaio, verifica-se que os grupos mais representativos nas fases de 2ª e 3ª secagem (correspondente ao produto final) são as bactérias proteolíticas, amonificantes e produtoras de trimetilamina, sendo que, a 3ª secagem é caracterizada por um teor máximo de bactérias proteolíticas. Nas fases de início de putrefacção e putrefacção os teores de bactérias proteolíticas e amonificantes (Figura 3.33) sofrem uma diminuição significativa ($p < 0,05$), mas observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do azoto não proteico (Figuras 3.39, 3.40 e 3.41) e do pH (Figura 3.38). Esta situação traduz um aumento da actividade das células microbianas, independente do aumento do número das mesmas. Todavia não é de descartar a hipótese de um erro de amostragem ligado à dificuldade já referida, em separar as células da estrutura essencialmente polisacarídica da reima.

Na fase de putrefacção prevalecem os grupos de bactérias que utilizam os compostos resultantes da proteólise, biosintetizando outros compostos azotados, responsáveis pela alteração das características sensoriais, ou seja, o grupo dos microrganismos produtores de TMA e o grupo dos amonificantes apesar de haver uma significativa ($p < 0,05$), redução do teor deste último grupo.

Como se detectou a presença de grupos bacterianos descarboxiladores de histidina e arginina considerou-se justificável a determinação do teor de aminas biogénicas. Pelos motivos apontados anteriormente, ligados à preservação da coluna do aparelho de HPLC, analisou-se apenas uma amostra por fase de estudo, e por indústria fornecedora. Os resultados obtidos encontram-se patentes na Tabela 3.9.

Os valores de histamina foram residuais e muito inferiores ao limite máximo legislado, apesar de algumas amostras terem apresentado um valor apreciável de bactérias produtoras de histamina (rubrica 3.5.1).

Por outro lado, o facto do valor mais elevado desta amina biogénica ter sido determinado no produto em putrefacção, onde não se detectou presença de microrganismos produtores de histamina pode ser explicado pelo facto de algumas bactérias não revelarem esta característica no meio de cultura de Niven (Niven *et al.*, 1981), utilizado neste estudo, como foi verificado por Silva *et al.*, (2002), em relação aos géneros *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp..

Apesar do grau de putrefacção alcançado, o teor de histamina detectado no peixe não representa risco para a saúde do consumidor.

Tabela 3.9 – Aminas biogénicas em amostras de bacalhau de duas diferentes indústrias fornecedoras (L e R), ao longo do processamento, até um estado de putrefacção.

| | Amostra | Tiramina (mg/kg)* | Putrescina (mg/kg)* | Cadaverina (mg/kg)* | Histamina (mg/kg)* |
|---|--------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| L | Salgado Verde | - | 31,6 | 119,7 | - |
| L | Pós Demolha | 4,3 | 10,1 | 185,0 | 6,1 |
| L | 1ªSecagem | 6,0 | 11,3 | 259,7 | - |
| L | 2ªSecagem | - | 6,0 | 51,9 | - |
| L | 3ªSecagem | - | 9,3 | 403,0 | 5,2 |
| L | Início putrefacção | - | 8,6 | 205,0 | - |
| L | Putrefacção | 26,2 | 39,8 | 583,0 | 21,9 |
| R | Salgado Verde | - | 6,4 | 15,6 | - |
| R | Pós Demolha | 4,0 | 3,9 | 42,5 | - |
| R | 1ªSecagem | 3,3 | 8,5 | 18,9 | - |
| R | 2ªSecagem | - | 16,3 | 17,5 | - |
| R | 3ªSecagem | 11,5 | 20,5 | 261,8 | - |
| R | Início putrefacção | - | 12,5 | 49,7 | - |
| R | Putrefacção | - | 3,7 | 67,2 | - |

Legenda: * em matéria seca

De acordo com Lehane e Olley (2000), a histidina é formada provavelmente por enzimas de bactérias que não estão envolvidas na descarboxilação da cadaverina e da putrescina, sendo que a cadaverina ocorre mais frequentemente no peixe deteriorado do que a histamina.

Para que haja formação de aminas biogénicas é necessário a presença de microrganismos descarboxilase positivos, bem como de aminoácidos livres.

De acordo com as condições do ensaio não foram detectados microrganismos descarboxiladores dos aminoácidos L-ornitina e de L-lisina (rubrica 3.5.1). O teor de microrganismos de L-arginina, envolvida na formação de putrescina, só foi relevante na fase de salgado verde e no produto final (correspondendo à 3ª secagem), pelo que não é possível estabelecer uma relação clara e inequívoca entre estes resultados e o teor destas aminas biogénicas.

A actividade descarboxilativa é mais forte em meios ácidos, com um pH óptimo entre 4 e 5. Nestas condições as bactérias são estimuladas a produzir estas enzimas como parte do seu sistema de defesa contra a acidez do meio. Também o factor temperatura é determinante, sendo que temperaturas entre 20 °C e 37 °C são as que mais favorecem o desenvolvimento das bactérias que contêm descarboxilases (Karovicová e Kohajdová,

2005). Frank *et al.*, (1985), refere que a formação das aminas biogénicas está mais relacionado com a actividade de microrganismos mesófilos do que de psicrotróficos.

De acordo com a evolução do teor de azoto dos aminoácidos livres verifica-se que este atinge um valor estatisticamente superior ($p < 0,05$) a partir da fase de 3ª secagem/produto, que coincide com um aumento do pH do meio. Por outro lado a partir desta fase o bacalhau é sujeito a armazenamento a temperaturas mais baixas, da ordem dos 15 °C.

Verificou-se que os níveis de putrescina são muito mais baixos do que os de cadaverina, o que, segundo Lehane e Olley (2000), é devido provavelmente às quantidades limitadas de ornitina no tecido do peixe.

Em relação à cadaverina a evolução ao longo das fases de processamento e putrefacção pode ser explicada pela interacção dos factores anteriormente assinalados: pH, temperatura, quantidade de aminoácidos livres (em particular lisina) e solubilização durante da demolha. No que concerne à putrescina parece evidente que durante a demolha ocorre uma solubilização, perdendo-se uma parte na água de demolha, e com as fases de secagem há uma concentração, que se reflecte numa tendência para um aumento dos valores.

3.5.3. Indicadores sensoriais

OBSERVAÇÕES GERAIS

No decorrer do processo fizeram-se observações do aspecto dos peixes. Após a primeira prensagem e primeira secagem os peixes provenientes da indústria **R** apresentaram um aspecto ainda húmido e sensível ao toque, evidenciando uma cor amarela âmbar intensa à superfície, que diminuía com a profundidade. Nas zonas do peixe mais finas a cor era mais intensa (Figura 3.42).

O corte foi fácil excepto nas asas que, sendo mais finas, apresentavam-se mais secas e duras. A carne interior detinha uma tonalidade amarelo palha e o cheiro era forte, sem ser desagradável. Não se observou sal à superfície mas denotou-se uma sensação pegajosa ao toque.

No peixe proveniente do fornecedor **L**, na mesma fase do processo, denotou-se um cheiro intenso à superfície (sem ser desagradável), uma menor resistência ao toque e sal à

superfície dos peixes, que se encontravam húmidos e com aspecto cru sanguinolento, sobretudo na orla da espinha.



Figura 3.42 – Aspecto típico de um bacalhau de cura amarela no final da primeira secagem.

Com as fases de prensagem/secagem subsequentes o peixe começou a apresentar maior resistência ao toque e uma diminuição do aroma “marinho” (um misto de iodo e sal).

Os peixes em putrefacção caracterizaram-se por um cheiro desagradável e intenso, aparecimento à superfície de muco amarelado e viscoso (reima), e alguns peixes apresentaram-se empoados (Figura 3.43).

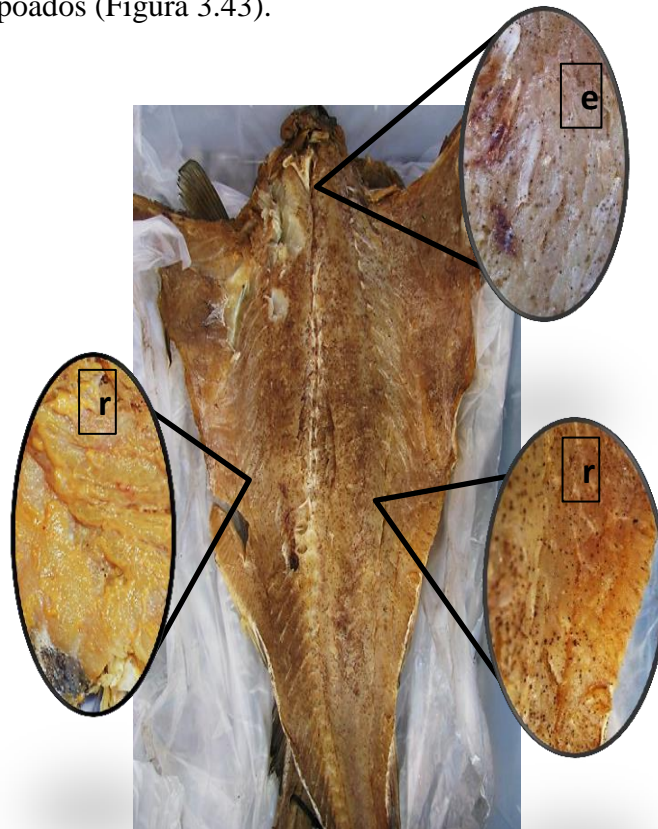


Figura 3.43 – Aspecto de um bacalhau de cura amarela em putrefacção: r – reima; e – empoadado.

DETERMINAÇÃO DA COR

Todas as amostras foram avaliadas em cru, em relação à cor. A comparação dos parâmetros L*, a*, b* apresentados por amostras de bacalhau ao longo do processo de cura, no produto final e no produto em putrefacção está patente na Figura 3.44.

No que respeita ao parâmetro L*, os valores significativamente ($p < 0,05$) mais elevados foram determinados nas fases de salgado verde e demolha, e em relação aos parâmetros a* e b*, foram determinados nas fases em que o bacalhau apresenta deterioração (início de putrefacção e putrefacção).

Verifica-se que na fase de demolha o valor de a* apresenta o valor mais baixo (mais negativo, correspondendo a uma intensificação do verde), aumentando significativamente ($p < 0,05$) com a secagem, ou seja no sentido de uma intensificação do encarnado.

O parâmetro b* apresenta com a demolha uma significativa diminuição ($p < 0,05$), que se traduz numa cor menos amarela. Este efeito pode estar associado ao aumento de volume de músculo. Com a fase subsequente de secagem verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$), deste parâmetro.

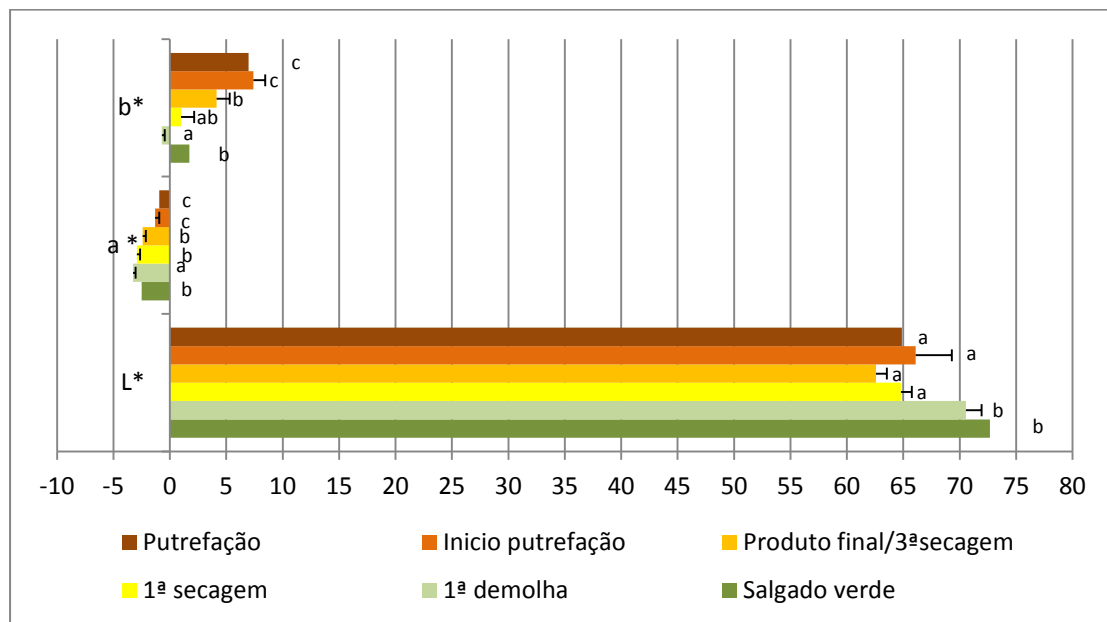


Figura 3.44 - Comparação dos parâmetros L*, a*, b* apresentados por amostras de bacalhau ao longo do processo de cura, no produto final e no produto em putrefacção. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Verifica-se a existência de diferenças significativas entre as diferentes fases.

Nguyen (2007) verificou também uma intensificação do encarnado e do amarelo com a secagem do bacalhau salgado.

Os valores do Cromo, determinados nas amostras provenientes das diferentes fases analisadas (Tabela 3.10), permitem inferir que com a secagem há uma intensificação da cor, reforçada com a putrefacção.

Tabela 3.10 - Comparação dos parâmetros croma e brancura apresentados por amostras de bacalhau de cura amarela ao longo do processo e aquando da putrefacção. As letras iguais junto aos valores médios indicam que não existem diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$).

| | Croma | Brancura |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Salgado verde | 3,34 ± 1,09 ^a | 72,45 ± 2,67 ^b |
| 1ª demolha | 3,36 ± 0,22 ^a | 70,35 ± 1,37 ^b |
| 1ª secagem | 3,11 ± 0,09 ^a | 64,65 ± 0,69 ^a |
| Produto final/3ªsecagem | 4,83 ± 1,03 ^{ab} | 62,27 ± 0,87 ^a |
| Início putrefacção | 7,53 ± 0,96 ^{bc} | 65,26 ± 3,01 ^a |
| Putrefacção | 7,17 ± 2,26 ^c | 64,12 ± 1,23 ^a |

Estes resultados sugerem que o bacalhau com a secagem sofre um escurecimento e que a deterioração do bacalhau reflecte-se num aumento significativo do amarelo. Tal como é referido por Soudan (1955), o amarelecimento é maior com a proteólise, e como foi observado no capítulo 3.5.1., a fase de 3ª secagem é a que apresenta maior teor de proteolíticos, coincidindo com um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do teor de aminoácidos livres e do parâmetro b*.

Rodrigues (2006), ao estudar a cor de amostras de bacalhau salgado verde, salgado seco e demolido observou um comportamento da cor semelhante, ou seja, amostras de demolidas apresentaram uma cor menos intensa quando comparadas com as amostras em seco, ocorrendo uma intensificação da cor com a secagem e uma atenuação do amarelecimento com a demolha.

Em relação ao bacalhau de cura amarela não se conhece nenhum estudo quantitativo.

ANÁLISE SENSORIAL

No que respeita à avaliação sensorial realizada pelo painel de provadores, verificou-se que os atributos cheiro característico, fermentado e marinho/salgado e a formação de baba do bacalhau em cru revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o produto final, próprio para consumo, e o bacalhau deteriorado (Figuras 3.45, 3.46 e 3.47). Importa, contudo, lembrar que o produto considerado em putrefacção no presente

estudo não cumpre, em rigor, os critérios de um produto em putrefacção (referidos anteriormente). O que pode constituir uma justificação para o facto dos provadores não terem sido muito sensíveis a características conotadas com a “verdadeira” putrefacção de um alimento. Desta forma o cheiro a batata, amoniacal e ranço não foram considerados relevantes pelo painel, apresentando pontuações médias inferiores a 0,65 (Figura 3.45).

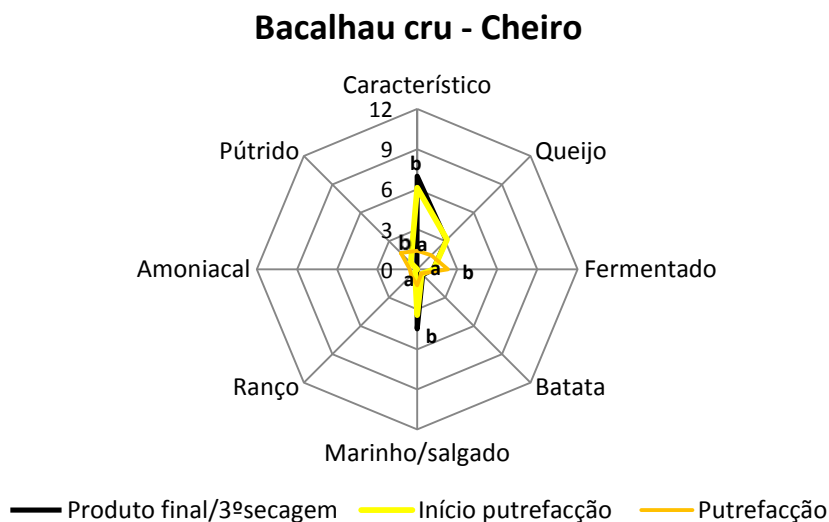


Figura 3.45 - Avaliação dos atributos relacionados com o cheiro, apresentados por amostras de bacalhau em cru, provenientes de diferentes fases do processo de cura, do produto final e do produto em putrefacção. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

O painel de avaliadores não conseguiu diferenciar as amostras com base na cor (Figura 3.46), o que indica que não foi sensível à alteração de cor, determinada quantitativamente pelo colorímetro.

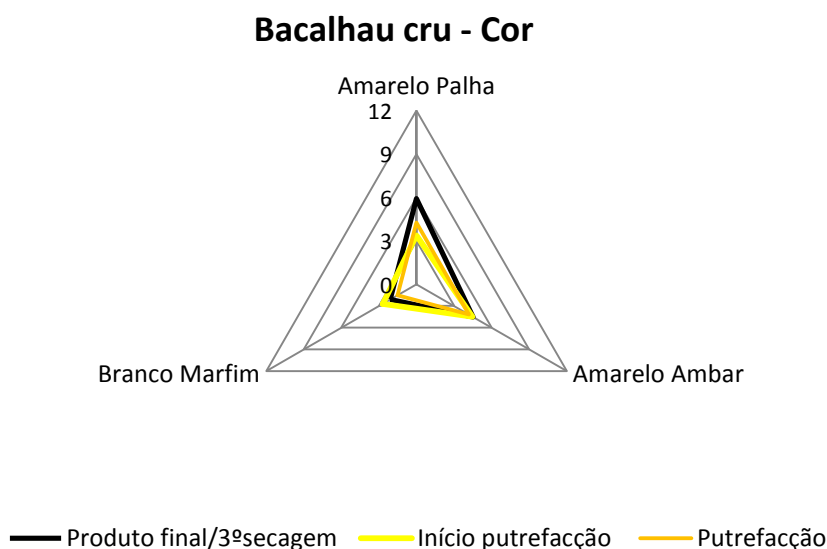


Figura 3.46 - Avaliação dos atributos relacionados com a cor apresentados por amostras de bacalhau em cru, provenientes de diferentes fases do processo de cura, do produto final e do produto em putrefacção.

Relativamente ao aspecto, o atributo baba (termo presente na folha de prova e que corresponde à reima) apresenta uma classificação significativamente superior ($p < 0,05$) nas amostras do bacalhau cru em putrefacção (Figura 3.47), embora seja um atributo pouco consolidado no painel pois apresenta um elevado desvio padrão.

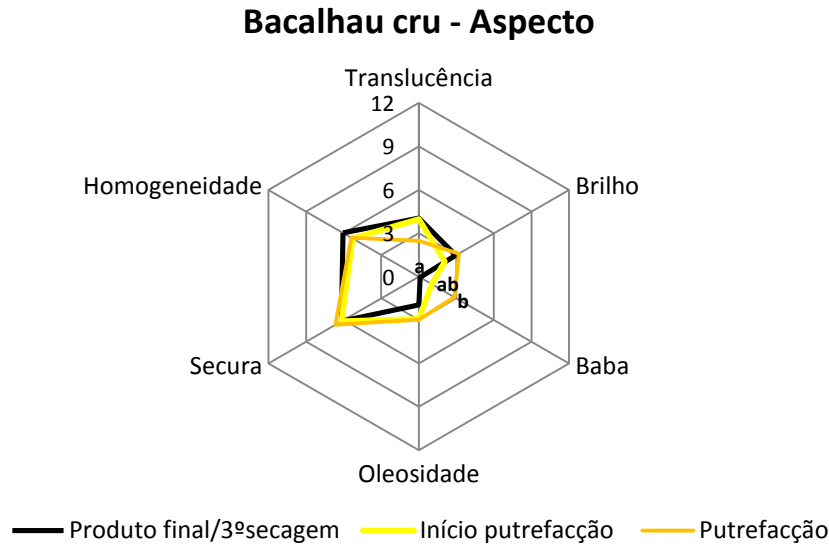


Figura 3.47 - Avaliação dos atributos relacionados com o aspeto apresentados por amostras de bacalhau em cru, provenientes de diferentes fases do processo de cura, do produto final e do produto em putrefacção. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

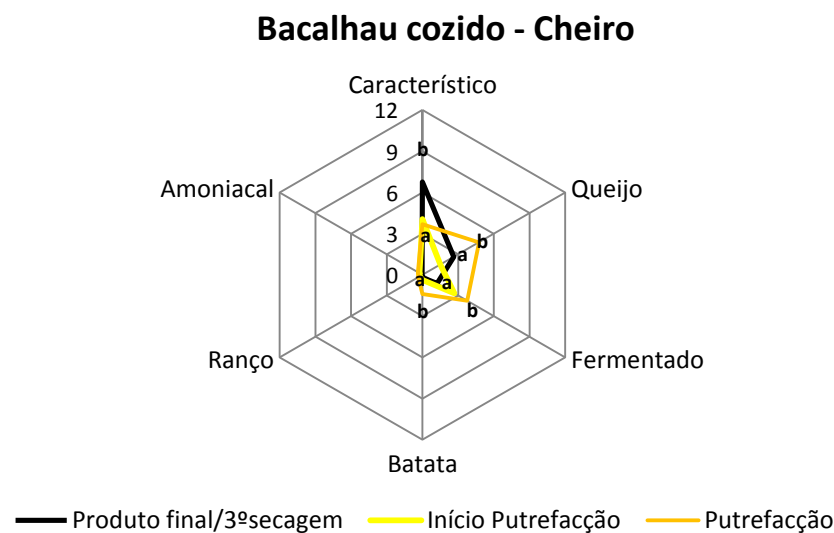


Figura 3.48 - Avaliação dos atributos relacionados com o cheiro apresentados por amostras cozidas de bacalhau provenientes de diferentes fases do processo de cura, do produto final e do produto em putrefacção. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

Quando o bacalhau foi avaliado em cozido, para além dos atributos cheiro característico e fermentado, as amostras revelaram também diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao cheiro a queijo e a batata, sendo que foram as amostras do bacalhau em

putrefacção as que apresentaram uma maior pontuação relativamente a estes últimos três atributos (Figura 3.48).

Quanto aos atributos relacionados com a cor/aspecto, apenas a cor amarelo palha constituiu um atributo discriminatório entre as amostras avaliadas, havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o bacalhau deteriorado (fase de início de putrefacção e putrefacção) e o produto final (Figura 3.49).

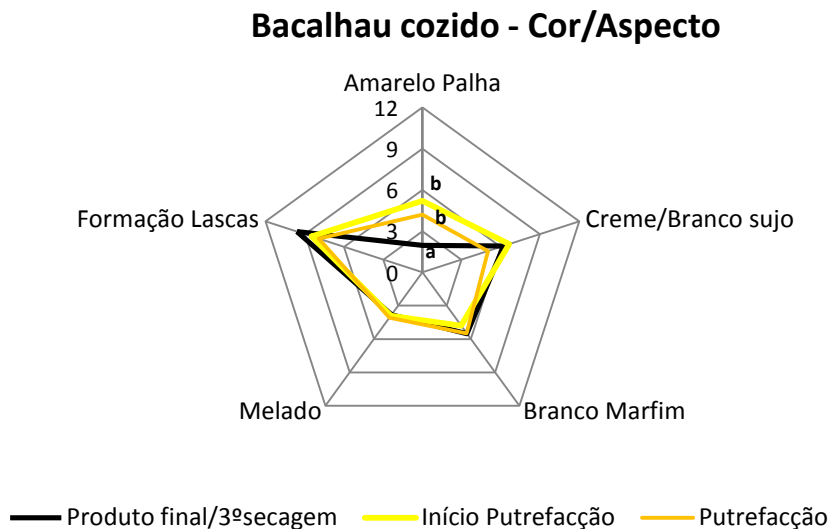


Figura 3.49 - Avaliação dos atributos relacionados com a cor/aspecto apresentados por amostras cozidas de bacalhau provenientes de diferentes fases do processo de cura, do produto final e do produto em putrefacção. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

No que concerne aos atributos relacionados com o sabor e textura a análise não pôde efectuar-se de forma completa pois os provadores rejeitaram as amostras de peixe em putrefacção. Por esta razão efectuou-se a avaliação destes atributos exclusivamente para o produto final e início de putrefacção, cujos resultados estão indicados na Figura 3.50.

Relativamente aos atributos sabor a ranço, fermentado e desagradável o painel não se mostrou sensível. Os provadores consideraram que tanto o produto próprio para consumo como o produto em início de deterioração apresentam sabor característico, não havendo diferenças significativas entre as amostras de uma e outra fase.

A elasticidade e untuosidade foram os atributos discriminatórios, apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

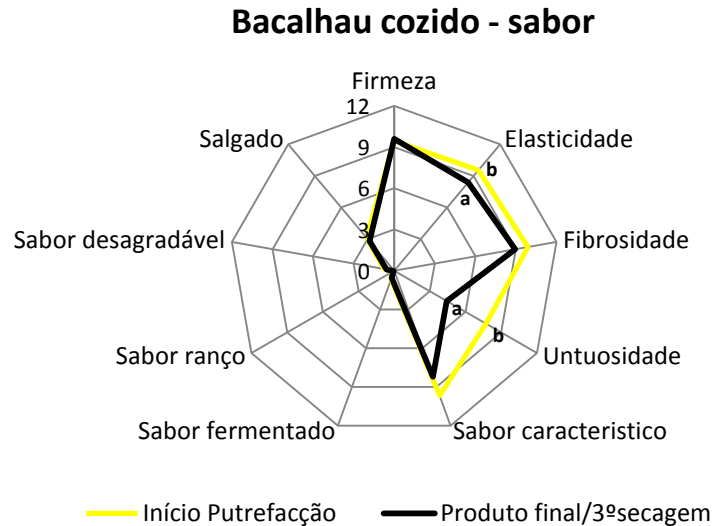


Figura 3.50 - Avaliação dos atributos relacionados com o sabor apresentados por amostras cozidas de bacalhau provenientes de diferentes fases do processo de cura, do produto final e do produto em putrefacção. As letras diferentes junto aos valores médios de um dado atributo indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

3.6. Perspectiva integrada dos resultados obtidos

Na análise integrada do estudo da dinâmica dos grupos funcionais bacterianos, que caracteriza o processo de cura amarela, contemplaram-se os resultados obtidos nas fases do processo, comuns aos ensaios 2, 3 e 5. O resumo desta análise encontra-se patente no gráfico da Figura 3.51.

Confirma-se que o perfil qualitativo dos grupos funcionais bacterianos, dentro de cada fase do processo analisada, não apresenta diferenças consideráveis. No que toca ao aspecto quantitativo ressaltam algumas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre os diferentes ensaios, dentro de uma mesma fase, para um mesmo grupo funcional. Neste contexto destaca-se o ensaio 5 como sendo aquele que apresenta valores significativamente superiores ($P < 0,05$), sobretudo na fase de produto final.

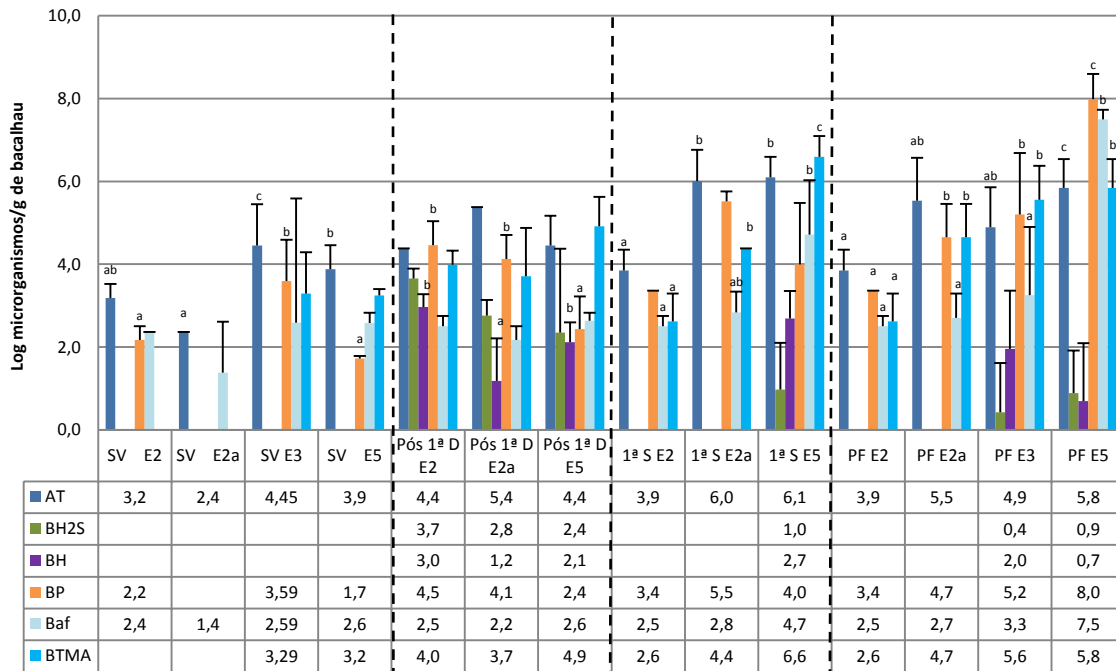


Figura 3.51 - Evolução dos diferentes grupos bacterianos funcionais ao longo do processo de cura, nos diferentes ensaios: SV(salgado verde); D (demolha); S (secagem); PF (produto final); E2 (ensaio 2 processo da empresa L); E2a (ensaio 2 processo da empresa R); E3 (ensaio 3); E5 (ensaio 5); AT (aeróbios totais); BH (bactérias produtoras de histamina); BTMA (bactérias produtoras de trimetilamina); B H2S (bactérias sulfitorredutoras/crescimento em Iron Agar); BP (bactérias proteolíticas); B As letras diferentes junto aos valores médios de um dado grupo funcional indicam diferenças estatisticamente significativas entre os ensaios dentro de uma mesma fase do processo ($p < 0,05$).

Com o intuito de realizar uma análise integrada e mais completa do elevado número de resultados obtidos em relação aos diferentes parâmetros analisados no presente estudo, procedeu-se a uma Análise em Componentes Principais (ACP).

Na caracterização do processo de preparação de cura amarela, incluindo o estudo de estabilidade do produto, contemplaram-se as variáveis: contagens dos grupos microbianos funcionais (bactérias aeróbias totais, sulfitorredutoras, produtoras de histamina, proteolíticas, amonificantes e produtoras de trimetilamina), teores dos parâmetros físico-químicos (% de humidade, % de cloretos, pH, ABVT, N-TMA), e quantificação relativa (%) dos diferentes géneros bacterianos identificados.

Verificou-se que 3 eixos/factores explicam 54% da variância inicial. Este valor, podendo ser considerado baixo, resulta do facto do sistema ser muito complexo, pois, como já foi referido anteriormente, o tipo de amostras alvo deste estudo implica logo à partida uma elevada diversidade. Uma diversidade relacionada por exemplo com o tipo de captura do peixe, estação e local de captura, forma e tempo de transporte,

manutenção, tipo de sal usado na salga verde, ou seja, variáveis que neste estudo não foi possível controlar.

Apesar destes condicionalismos, este estudo permite efectuar uma análise abrangente.

A Figura 3.52 apresenta a ACP para duas dimensões (Dim 1 e Dim 2).

Neste caso, a Dim 1 explica 20,4% da variação, podendo este eixo ser interpretado como um gradiente de variação de teor de aeróbios totais (AT), bactérias proteolíticas (BP), amonificantes (Baf), produtoras de trimetilamina (BTMA) e de distribuição dos isolados identificados como pertencentes ao género *Alcaligenes*.

A Dimensão 2 corresponde a 16,9% da variação, sendo este eixo explicado pela variação da % de humidade e do teor de bactérias sulfitorredutoras (BH₂S) e produtoras de histamina (BH), por oposição ao teor de ABVT, N-TMA e percentagem de isolados identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus*.

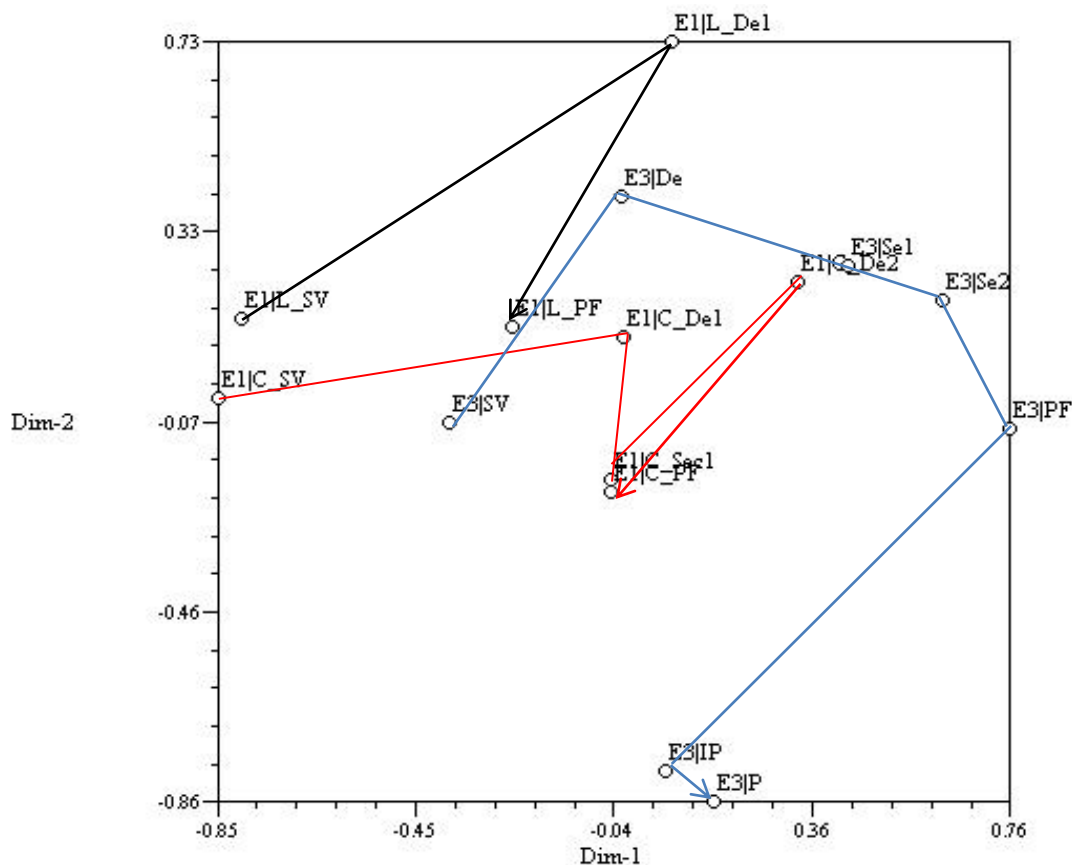


Figura 3.52 – Diagrama bi-factorial (Dim 1 e Dim 2) de projecção obtido a partir da análise em componentes principais baseada em resultados de diferentes grupos funcionais microbianos, géneros microbianos identificados e parâmetros físico-químicos, nas diferentes fases da cura amarela e putrefacção: E1|C_SV; E1|L_SV (ensaio 1, salgado verde, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_De1; E1|C_De2; E1|L_De1(ensaio 1, fases de demolhas, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_Se1; E1|L_Se1(ensaio 1, fases de secagem, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_PF; E1|L_PF(ensaio 1, produto final, oriundos da empresa C e L respectivamente); E3|SV, E3|De, E3|Se1, E3|Se2, E3|PF, E3|IP, E3|P (ensaio 5, fases de salgado verde, demolha, primeira secagem, segunda secagem, terceira secagem/produto final, início putrefacção e putrefacção, respectivamente).

Desta forma a progressão observável na Figura 3.52, da fase de salgado verde até ao produto final ou produto em putrefacção (evidenciada pelos vectores de diferentes cores, consoante o ensaio e/ou origem), tem por base, ao longo do eixo Dim 1, o aumento do teor de bactérias aeróbias totais, proteolíticas, amonificantes e produtoras de trimetilamina, bem como da percentagem de *Alcaligenes* spp., realçando sobretudo, a diferenciação da fase de salgado verde.

Ao longo do eixo Dim 2, esta progressão faz-se sobretudo pelo aumento da humidade e do teor de bactérias sulfitorredutoras e produtoras de histamina, que caracteriza particularmente as fases de demolha, por oposição a um maior teor de ABVT e de N-TMA e maior percentagem de isolados de *Staphylococcus* spp., que qualifica especialmente o estado de putrefacção.

A Figura 3.53 diz respeito à projecção nos eixos Dim 1 e Dim 3.

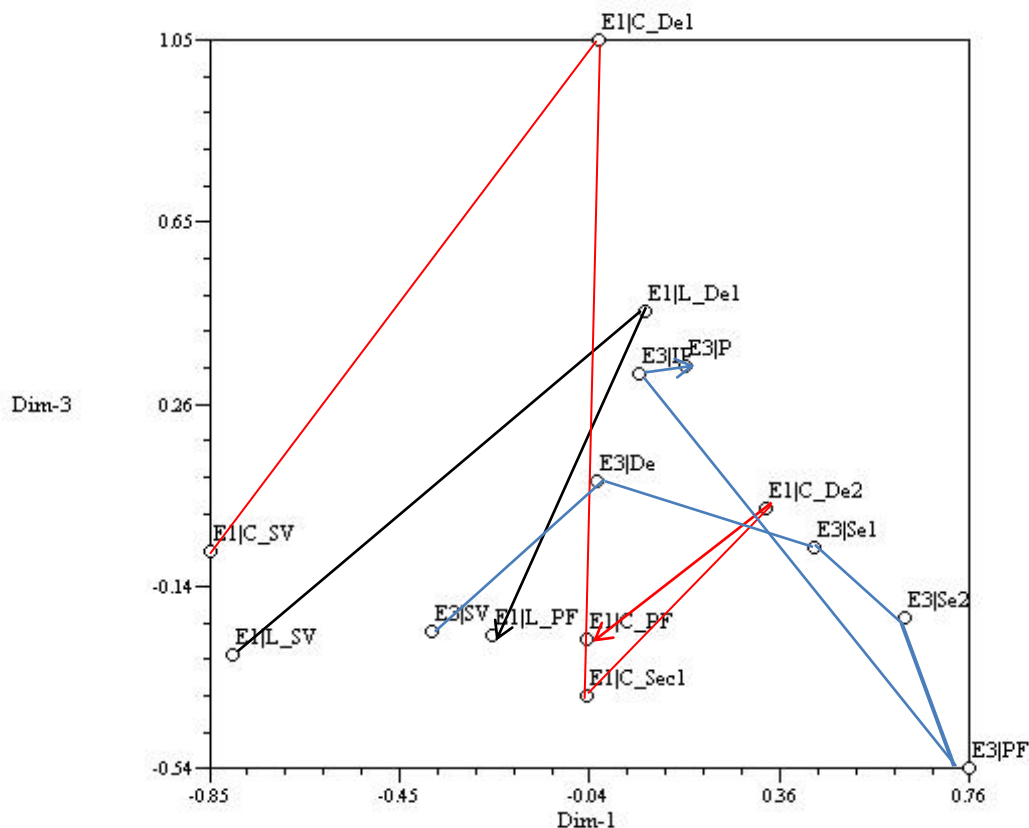


Figura 3.53 - Diagrama bi-fatorial (Dim 1 e Dim 3) de projecção obtido a partir da análise em componentes principais baseada em resultados de diferentes grupos funcionais microbianos, géneros microbianos identificados e parâmetros físico-químicos, nas diferentes fases da cura amarela e putrefacção: E1|C_SV; E1|L_SV (ensaio 1, salgado verde, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_De1; E1|C_De2; E1|L_De1 (ensaio 1, fases de demolhas, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_Se1; E1|L_Se1 (ensaio 1, fases de secagem, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_PF; E1|L_PF (ensaio 1, fases de produto final, oriundos da empresa C e L respectivamente); E3|SV, E3|De, E3|Se1, E3|Se2, E3|IP, E3|P (ensaio 5, fases de salgado verde, demolha, primeira secagem, segunda secagem, terceira secagem/produto final, início putrefacção e putrefacção, respectivamente).

A dimensão 3 corresponde a 16,5% da variação inicial, sendo este eixo explicado pela variação da percentagem de isolados identificados como pertencentes aos géneros *Morganella* e *Oceanimonas*, o que permite destacar as fases de demolha das restantes.

Na Figura 3.54 apresenta-se o diagrama tridimensional da análise em componentes principais, é possível discriminar as fases de demolha, salgado verde e putrefacção de acordo com o que já foi explanado anteriormente.

Verificou-se pela análise das correlações entre as diferentes variáveis consideradas (Anexo V), que o teor de N-TMA está correlacionado positivamente com o teor de ABVT. Os teores de bactérias sulfitorredutoras e produtoras de histamina estão correlacionados positivamente entre si, e correlacionados positivamente com a percentagem de humidade.

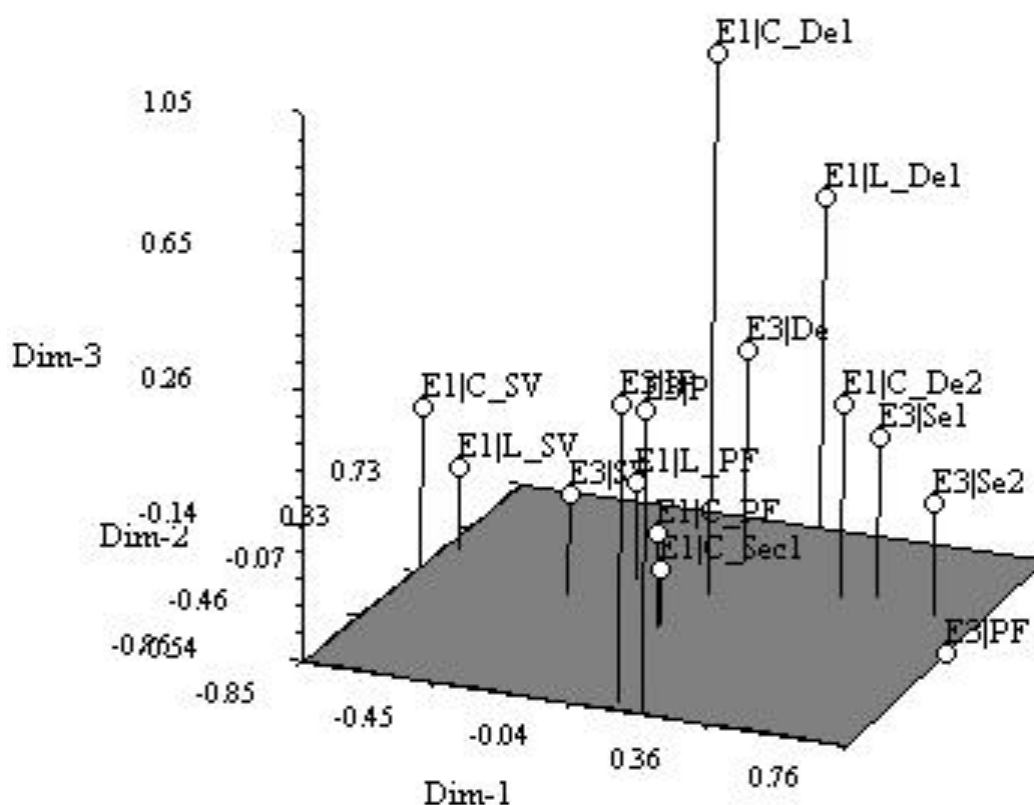


Figura 3.54 – Diagrama tridimensional (Dim 1, Dim 2 e Dim3) correspondente à análise em componentes principais baseada em resultados de diferentes grupos funcionais microbianos, géneros microbianos identificados e parâmetros físico-químicos, nas diferentes fases da cura amarela e putrefacção: E1|C_SV; E1|L_SV (ensaio 1, salgado verde, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_De1; E1|C_De2; E1|L_De1 (ensaio 1, fases de demolhas, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_Se1; E1|L_Se1 (ensaio 1, fases de secagem, oriundos da empresa C e L respectivamente); E1|C_PF; E1|L_PF (ensaio 1, fases de produto final, oriundos da empresa C e L respectivamente); E3|SV, E3|De, E3|Se1, E3|Se2, E3|PF, E3|IP, E3|P (ensaio 5, fases de salgado verde, demolha, primeira secagem, segunda secagem, terceira secagem/produto final, início putrefacção e putrefacção, respectivamente).

Constatou-se também que a percentagem de isolados identificados como pertencendo ao género *Shewanella* está correlacionada positivamente com o teor do grupo funcional das bactérias sulfitorredutoras, e a do género *Alcaligenes* com o teor das bactérias amonificantes.

É possível depreender que o bacalhau demolhado se destaca do bacalhau nas restantes fases de preparação pelo maior teor de humidade, bactérias sulfitorredutoras e produtoras de histamina. Isto é reforçado pelo facto de que outra das características que destaca esta fase, de acordo com a ACP, ser a maior percentagem de *Morganella* spp. e *Oceanimonas* spp. Estes géneros microbianos são associados a elevada actividade sulfitorredutora (Gram et Huss 1996; López-Caballero et al., 2001; Rodrigues et al., 2003).

O bacalhau em fase de putrefacção diferencia-se sobretudo pelo teor de ABVT, N-TMA e percentagem de isolados do género *Staphylococcus*, verificando-se que existe uma elevada correlação positiva entre estas variáveis.

O bacalhau salgado verde apresenta menores teores dos grupos microbianos funcionais aeróbios totais, proteolíticos, amonificantes, produtores de trimetilamina, que aumentam nas fases de secagem e produto final; apesar de se ter verificado que a fase de salgado verde apresenta um teor em cloretos superior aos das outras fases, esta característica não se verificou como relevante em termos discriminatórios na ACP.

Os resultados obtidos na comparação entre produtos de cura amarela e cura branca também foram submetidos a uma análise em componentes principais (Figura 3.55). Recorde-se que com este estudo procurou-se diferenciar o bacalhau de cura branca do bacalhau de cura amarela, bem como averiguar eventuais diferenças entre o bacalhau de cura amarela, obtido ao fim de 3 semanas, e o bacalhau de cura amarela com uma maturação extra de 3 meses.

Verificou-se que os dois primeiros factores explicam 100% da variância inicial (correspondendo Dim 1 a 58,3% e Dim 2 a 41,7%), sendo notória uma diferenciação entre a cura branca e a cura amarela.

Os produtos de cura amarela caracterizam-se por elevados teores de humidade, ABVT, N-TMA, aminoácidos livres e proteína, por oposição à elevada percentagem de cloretos, de gordura e cinza dos produtos de cura branca. Relativamente aos grupos funcionais bacterianos, o bacalhau de cura amarela apresentou elevado teor de bactérias aeróbias totais, proteolíticas, amonificantes, produtoras de trimetilamina e histamina por oposição ao elevado teor de bactérias lácticas e sulfitorredutoras.

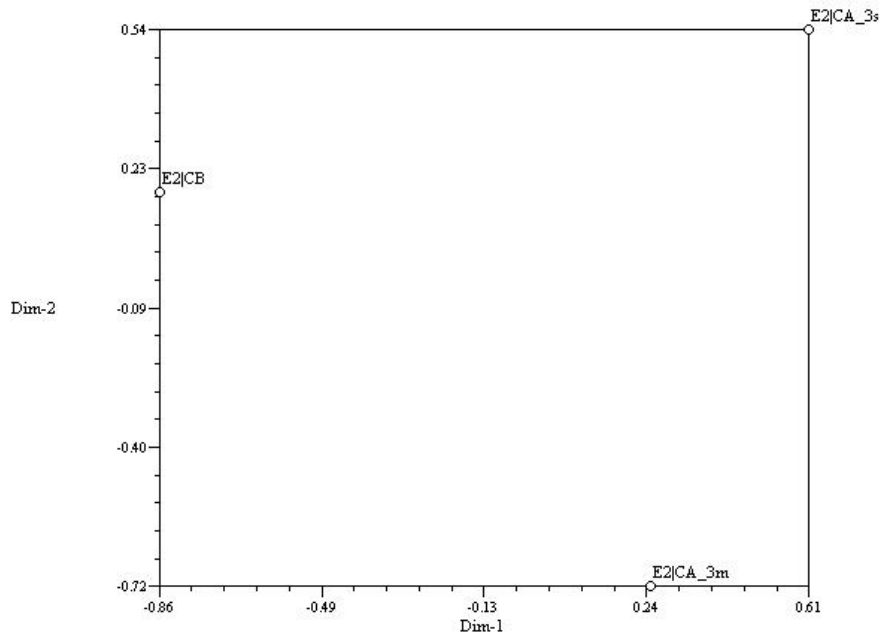


Figura 3.55 - Diagrama bi-factorial (Dim 1 e Dim 2) de projecção obtido a partir da análise em componentes principais baseada em resultados de diferentes grupos funcionais microbianos, géneros microbianos identificados, parâmetros físico-químicos e sensoriais no bacalhau de cura branca (E2|CB), cura amarela 3 semanas (E2|CA_3s) e cura amarela 3 meses (E2|CA_3m).

As variáveis sensoriais também constituem elementos de discriminação, sendo que, o cheiro a queijo, cor palha, cor ambar e brilho exibem maior relevância nos produtos de cura amarela, por oposição à cor marfim evidente no produto de cura branca.

A cura amarela de 3 meses destaca-se da cura amarela de 3 semanas pelo elevado teor de grupos sulfitorredutores, elevada percentagem de *Staphylococcus* spp., *Stenotrophomonas* spp., e grupos bacterianos detectados por pirosequenciação (*Veillonellaceae*, *Oscillospiraceae*, *Akalibacterium* spp., *Vagococcus* spp., *Chryseobacterium* spp., *Variovara* spp., *Phyllobacterium* spp., *Rhodobacter* spp., *Shewanella* spp., *Oceanisphaera* spp., *Pseudomonas* spp., *Desulfovibrio* spp., *Ornithinococcus* spp. e *Dietzia* spp.). O produto de cura amarela de 3 semanas diferencia-se do de 3 meses pela elevada percentagem do género *Halomonas* (detectado por pirosequenciação).

No estudo da estabilidade do produto, efectuou-se uma ACP em relação às variáveis estudadas no produto final de cura amarela, produto em início de putrefacção e produto em putrefacção (Figura 3.56), verificando-se que os dois primeiros factores explicam 100% da variância inicial.

A 1ª dimensão explica 78,9% da variação, tendo maior peso explicativo no produto final o teor de humidade e cloretos do produto, o teor de bactérias sulfitorredutoras, produtoras de

histamina, proteolíticas, amonificantes e produtoras de trimetilamina, bem como a percentagem dos isolados identificados como pertencentes aos géneros *Exiguobacterium*, *Alcaligenes* e *Stenotrophomonas*.

Também são relevantes, por oposição aos referidos e com maior peso nos produtos em início de putrefacção e putrefacção, o teor ABVT, N-TMA, pH, percentagem dos isolados identificados como pertencentes aos géneros *Psychrobacter* e *Staphylococcus*, e ainda as variáveis sensoriais baba, cheiro a fermentado em cozido e a pútrido, em cozido e cru.

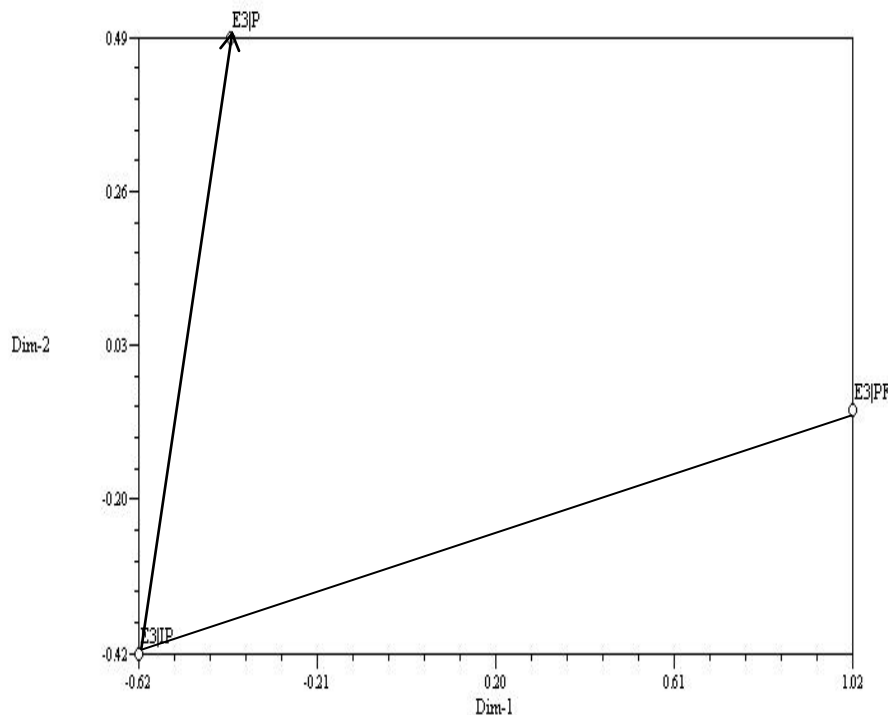


Figura 3.56 - Diagrama bi-fatorial (Dim 1 e Dim 2) de projecção obtido a partir da análise em componentes principais baseada em resultados de diferentes grupos funcionais microbianos, géneros microbianos identificados, parâmetros físico-químicos e sensoriais, na terceira secagem/produto final (E3|PF), início putrefacção (E3|IP) e putrefacção (E3|P).

Nesta análise constata-se que as percentagens de *Psychrobacter* spp. e *Staphylococcus* spp. apresentam uma elevada correlação positiva com os teores de ABVT e N-TMA, existindo também uma elevada correlação negativa entre estes últimos e o teor de cloretos. Por outro lado, existe uma elevada correlação negativa entre o pH e o teor de cloretos no produto. Apenas algumas espécies do género *Psychrobacter* (*Psychrobacter cibarius* e *Psychrobacter maritimus*) são reconhecidas como produtoras de trimetilamina, se bem que em quantidades consideradas baixas comparativamente às produzidas por *Photobacterium phosphoreum* e *Shewanella putrefaciens*. Apesar de não serem considerados como

importantes agentes de deterioração do peixe, podem explicar o odor desagradável que o peixe em início de deterioração pode apresentar (Mejlholm *et al.*, 2005).

Destaca-se ainda uma correlação positiva muito elevada entre o cheiro fermentado e pútrido, no produto cozido, com o teor de ABVT e N-TMA.

A 2ª dimensão explica 21,1% da variação, permitindo diferenciar o produto em início de putrefacção do produto já em putrefacção. O elevado teor de aeróbios totais e o cheiro a fermentado em cru são mais importantes no início de putrefacção por oposição às variáveis teor de aminoácidos livres e cheiro intenso a queijo quando cozido, mais relevantes no produto em putrefacção.

Da análise global é possível inferir que o bacalhau de cura amarela é caracterizado por maiores níveis de humidade e de azoto não proteico, sendo que este aumenta com a deterioração do produto, tal como o valor de pH, confirmando maior actividade proteolítica e amonificante dos microrganismos.

Os teores mais elevados de azoto não proteico coincidem sensorialmente com forte cheiro a queijo, que se intensifica com a putrefacção no produto cozido.

No processo de preparação do bacalhau de cura amarela verifica-se que o produto final se afasta do peixe salgado verde, apresentando teores mais elevados de bactérias proteolíticas, amonificantes e produtoras de trimetilamina. Estes são os grupos que se tornam dominantes com o processo de cura amarela, ou seja à medida que o teor de sal diminui.

A diminuição do teor de cloretos no produto corresponde a um valor mais elevado de pH, o que vem reforçar que, com menor teor de sal, se reúnem condições para um maior desenvolvimento e actividade microbiana.

O teor de ABVT, de N-TMA, o valor de pH, a percentagem dos isolados identificados como pertencentes aos géneros *Psychrobacter* e *Staphylococcus*, bem como as variáveis sensoriais baba, cheiro a fermentado e a pútrido são os indicadores com maior peso nos produtos em início de putrefacção e durante a putrefacção, fases em que apresentam maiores valores.

Existe uma correlação positiva entre a concentração de ABVT e N-TMA e os índices de *Psychrobacter* spp. e *Staphylococcus* spp., o que sugere o papel que estes microrganismos desempenham na formação de azoto não proteico, associada ao processo de cura amarela.

3.6.1. Dinâmica populacional dos grupos funcionais de microrganismos do bacalhau, estudados ao longo do processo de cura

Numa matriz tão complexa como o bacalhau ao longo do processo de cura, seja a cura branca ou a amarela, não se pode ter a veleidade de tipificar com rigor os grupos principais de microrganismos viáveis presentes, dada a dificuldade, antes de mais, de conseguir a sua recuperação. Não surpreenderá, pois, que os resultados sejam fortemente dependentes dos métodos, meios de cultura e condições de incubação escolhidos. Assim sendo, a interpretação de quaisquer resultados obtidos não deverá ser demasiado minuciosa nem ambiciosa, sob risco de não ter significado ecológico e, portanto, tornar-se inútil ou irreal. É o que acontece quando se recorre à técnica da pirosequenciação do DNA microbiano presente nas amostras de bacalhau, cujos resultados traduzem não só a presença de células microbianas viáveis cultiváveis, mas também de células viáveis não cultiváveis e de células não viáveis, que permanecem no bacalhau por mais ou menos tempo. Desta forma, não é de estranhar que, com este método, tenham sido identificadas 16 unidades taxonómicas operacionais (UTO) para o bacalhau de cura branca, 31 UTO para o bacalhau de cura amarela e 41 para o bacalhau de cura amarela com mais de três meses de maturação. No entanto, o seu significado ecológico é mínimo ou, mesmo, nulo, sendo de pouca ou nenhuma utilidade numa perspectiva industrial.

Foi com base nestes pressupostos que se estabeleceu o delineamento experimental e se optou pelo método dos tubos múltiplos para entender a dinâmica das populações dos grupos funcionais pré-estabelecidos. Assim, esta análise incidiu nos tubos correspondentes às maiores diluições, com crescimento positivo, de forma a estabelecer quais os géneros bacterianos dominantes nas várias fases do processo de cura. A partir de todos os resultados obtidos foi possível construir o esquema representado na Figura 3.57, onde é indicada, para cada fase de preparação do bacalhau de cura amarela e posteriormente para as fases de deterioração, a carga microbiana dominante e os géneros bacterianos presentes.

O bacalhau salgado verde apresenta uma carga microbiana inferior a 10^5 cél/g, tanto de bactérias Gram⁺ como Gram⁻ sendo os géneros dominantes *Exiguobacterium* e *Oceanisphaerae*, *Alcaligenes* e *Psychrobacter*, respectivamente. A carga microbiana é bastante inferior à característica do pescado fresco (Huss, 1995; Austin, 2006) sugerindo

que o efeito do sal foi eficaz na inibição ou morte de grande parte da microbiota presente antes da salga.

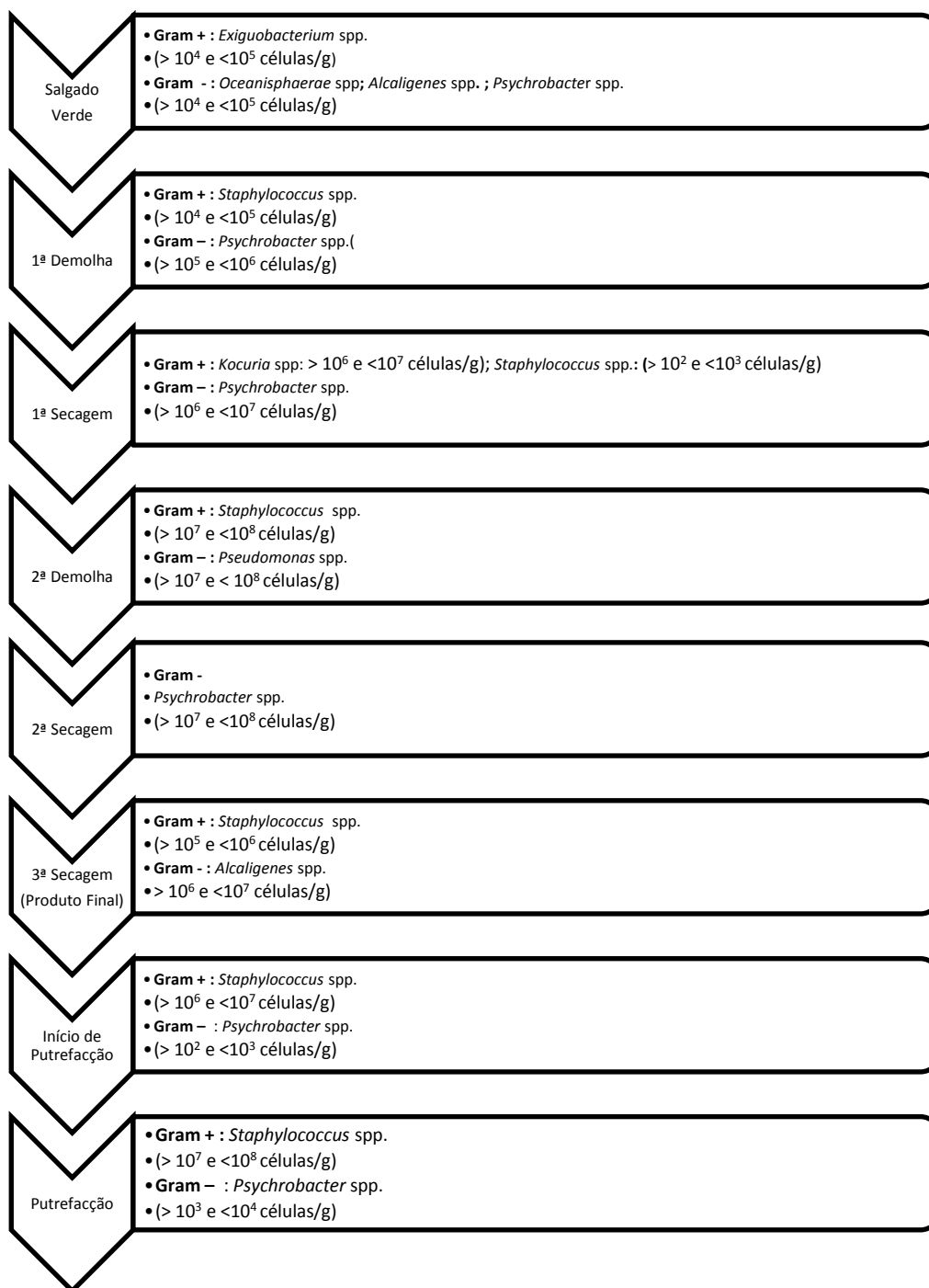


Figura 3.57 – Dinâmica das populações dos géneros bacterianos dominantes no bacalhau ao longo do processo de cura amarela e deterioração provocada. As cargas microbianas indicadas têm por base a maior diluição em que foram isoladas as estirpes identificadas, por fase estudada, no conjunto dos ensaios (Informação patente no Anexo II).

Embora não estejam identificadas as espécies é de admitir que estas bactérias sejam próprias do ambiente marinho em que vive o bacalhau, pois grande parte das espécies destes géneros são características de ambientes frios, tanto marinhos como terrestres (Shewan, 1961; Huss, 1995; Gram e Huss, 1996; Bozal *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*,

2012). Os dados referentes à primeira demolha mostram que a remoção do sal foi favorável à recuperação de células dos géneros *Staphylococcus* e *Psychrobacter* dado que o primeiro não era detectável em concentrações superiores a 10^4 cél./g e o segundo teve um aumento de uma ordem de grandeza relativamente ao bacalhau salgado verde. Pode-se, pois, concluir que uma grande parte das células presentes no bacalhau salgado verde (cerca de 90% no caso das células de *Psychrobacter* spp.) estaria no estado de “viáveis mas não cultiváveis”. Não é, no entanto, de excluir a hipótese de ter havido crescimento microbiano durante as 14 h, a 22 °C, em que decorreu a demolha. Em favor desta hipótese está o facto de alguns dos indicadores físico-químicos medidos ao longo do processo terem variado após a primeira demolha, como o pH, que aumentou provavelmente por acção de bactérias amonificantes, bem como os teores de ABVT e de N-TMA.

Ao fim da primeira secagem a carga microbiana, tanto de bactérias proteolíticas como produtoras de trimetilamina, tornou a aumentar uma ordem de grandeza relativamente à demolha anterior, facto aparentemente surpreendente, tendo em conta que o teor de humidade diminuiu e, conseqüentemente, o ambiente deveria ter ficado mais desfavorável para a microbiota presente. Não se pode, no entanto, ignorar que a secagem foi precedida de uma operação de enxugo e de prensagem, com o intuito de extrair água dos tecidos internos do peixe, que terá provocado uma migração de microrganismos para a superfície arrastados na água. Após a segunda demolha a carga microbiana tornou, de novo, a aumentar cerca de uma ordem de grandeza, tanto em bactérias Gram⁺ como Gram⁻. Os géneros dominantes (*Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp.) terão sido diferentes dos detectados na operação anterior, porque foram isolados a partir dos tubos com meio de cultura para pesquisa de bactérias aeróbias totais, e não de tubos com meios para bactérias proteolíticas e produtoras de trimetilamina. No entanto, na segunda secagem, confirma-se novamente o aumento de uma ordem de grandeza das bactérias proteolíticas e, mais concretamente, das do género *Psychrobacter*, que parece ser o principal protagonista do processo de cura. Com a secagem final a carga microbiana é reduzida cerca de duas ordens de grandeza no que respeita a Gram⁺ e uma ordem de grandeza nos Gram⁻, indiciando a estabilidade microbiológica. Quando se induziu o processo de putrefacção, tanto pelo aumento da temperatura como da humidade relativa, a carga microbiana aumentou várias ordens de grandeza, principalmente as bactérias Gram⁺ do género *Staphylococcus*, bem como os

parâmetros físico-químicos mais relevantes – pH, ABVT e N-TMA. O aspecto visual, com a formação característica de reima, e o cheiro repulsivo, denuncia uma actividade microbiana intensa, com formação de compostos reduzidos de enxofre, amins biogénicas (em baixo teor), amoníaco e trimetilamina. Embora o género *Staphylococcus* tenha sido o dominante, justificando-se identificá-lo como um indicador microbiológico de deterioração do bacalhau de cura amarela, é de admitir o envolvimento de outros géneros de bactérias, nomeadamente Gram⁺.

Quando se compara a carga microbiana do produto final da cura branca (Figura 3.58) com a do produto final da cura amarela constata-se, como era de esperar, um valor menor – cerca de uma ordem de grandeza – no bacalhau de cura branca, embora a população pareça ter uma composição semelhante.

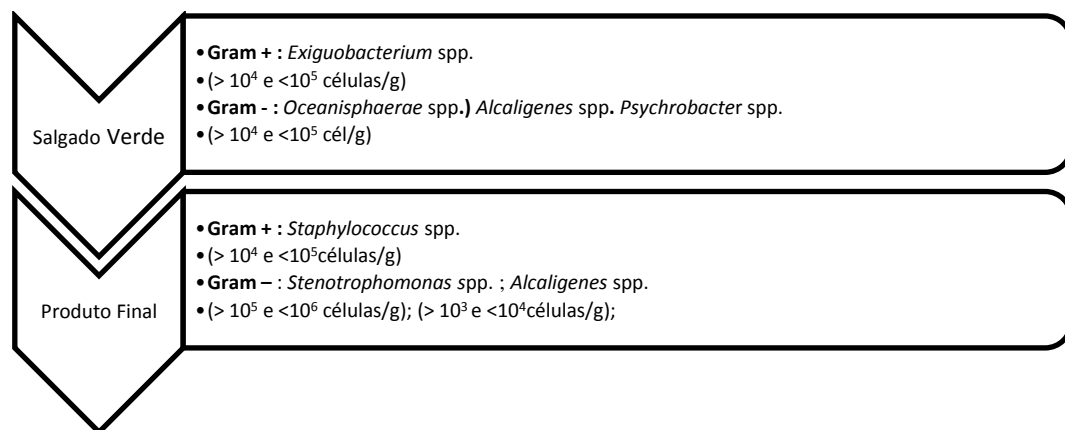


Figura 3.58 – Dinâmica das populações dos géneros bacterianos dominantes no bacalhau ao longo do processo de cura branca. As cargas microbianas indicadas têm por base a maior diluição em que foram isoladas as estirpes identificadas, por fase estudada, no conjunto dos ensaios (Informação patente no Anexo II).

De facto, os géneros de bactérias Gram⁺ e Gram⁻ dominantes parecem ser os mesmos nos dois tipos de cura, podendo contribuir para esta conclusão o facto dos meios de cultura e as condições ambientais em que foram isolados, terem sido os mesmos nos dois casos (meio para BTMA). Numa perspectiva ecológica poder-se-á afirmar que, respeitando-se as boas práticas fabris, a população microbiana do bacalhau curado terá por base a população original do bacalhau fresco – dominada por grupos halotolerantes e psicrotróficos – que é, total ou parcialmente, condicionada durante o processamento, pela teor de sal, teor de humidade e temperatura.

3.7. Purificação e caracterização química do pigmento presente no bacalhau de cura amarela

Neste ensaio procurou-se fazer a caracterização do pigmento amarelo típico do bacalhau de cura amarela.

O composto relacionado com o pigmento foi aquele que se conseguiu separar com água e metanol. No caso da fracção LB5 (amostra de produto final), corresponde ao código LB5a e no caso da fracção LB4 (amostra da fase de segunda secagem), corresponde ao código LB4a.

As figuras seguintes (Figuras 3.59. a 3.66 e do Anexo VII), dizem respeito aos espectros ^1H RMN e ^{13}C RMN; DEPT, HMBC, HMQC a partir dos quais se procurou delinear uma possível estrutura química.

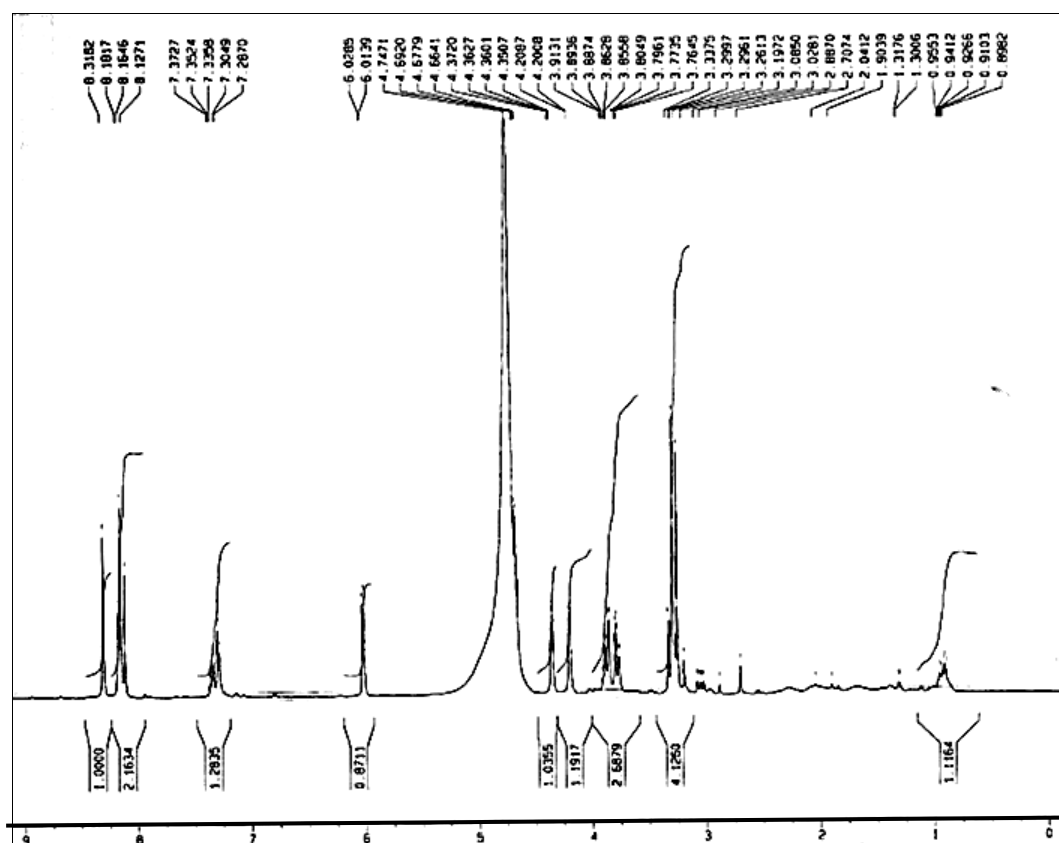


Figura 3.59 - Espectro ^1H RMN da amostra LB5 a

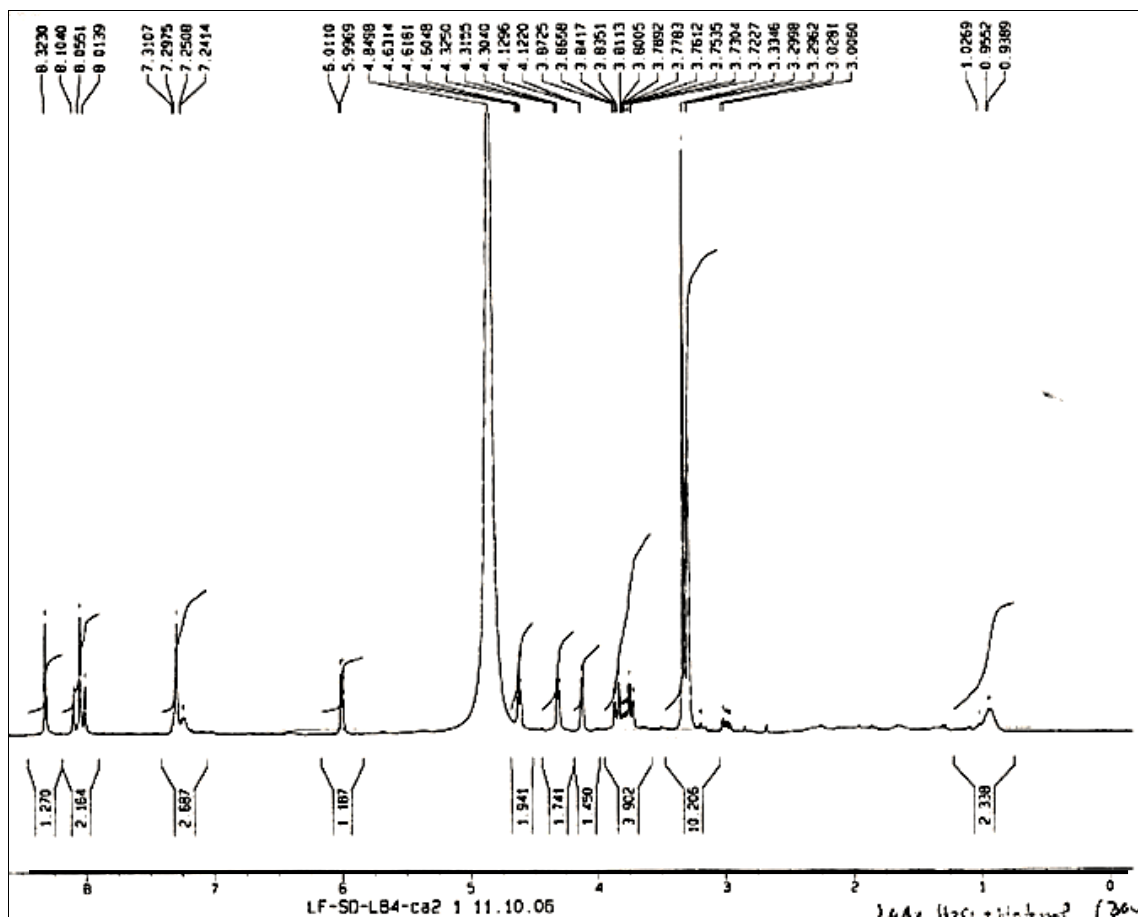


Figura 3.60 - Espectro ^1H RMN da amostra LB4 a.

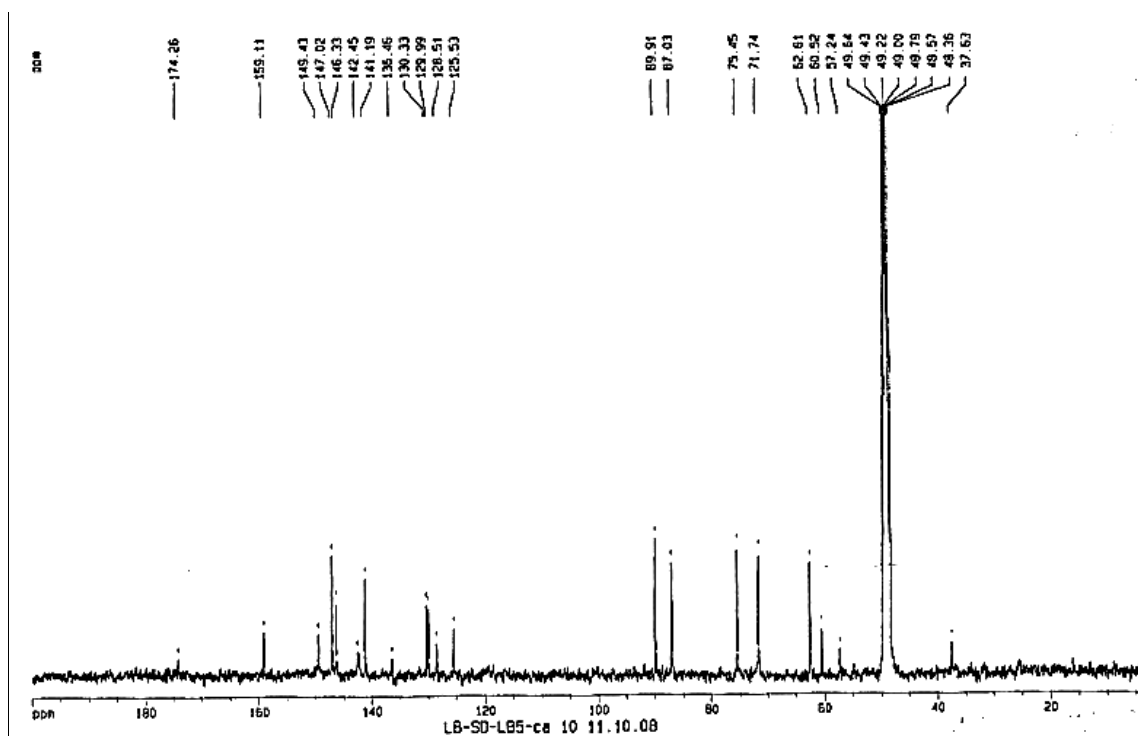


Figura 3.61 - Espectro ^{13}C RMN da amostra LB5a.

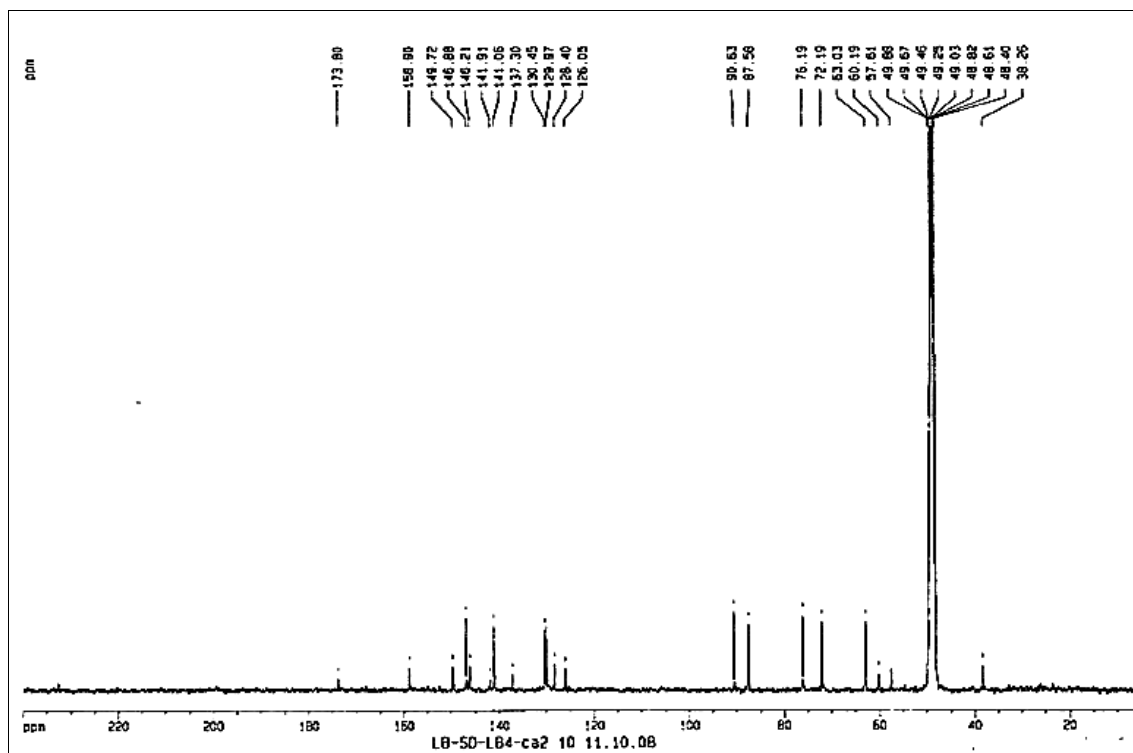


Figura 3.62 - Espectro ^{13}C RMN da amostra LB4.

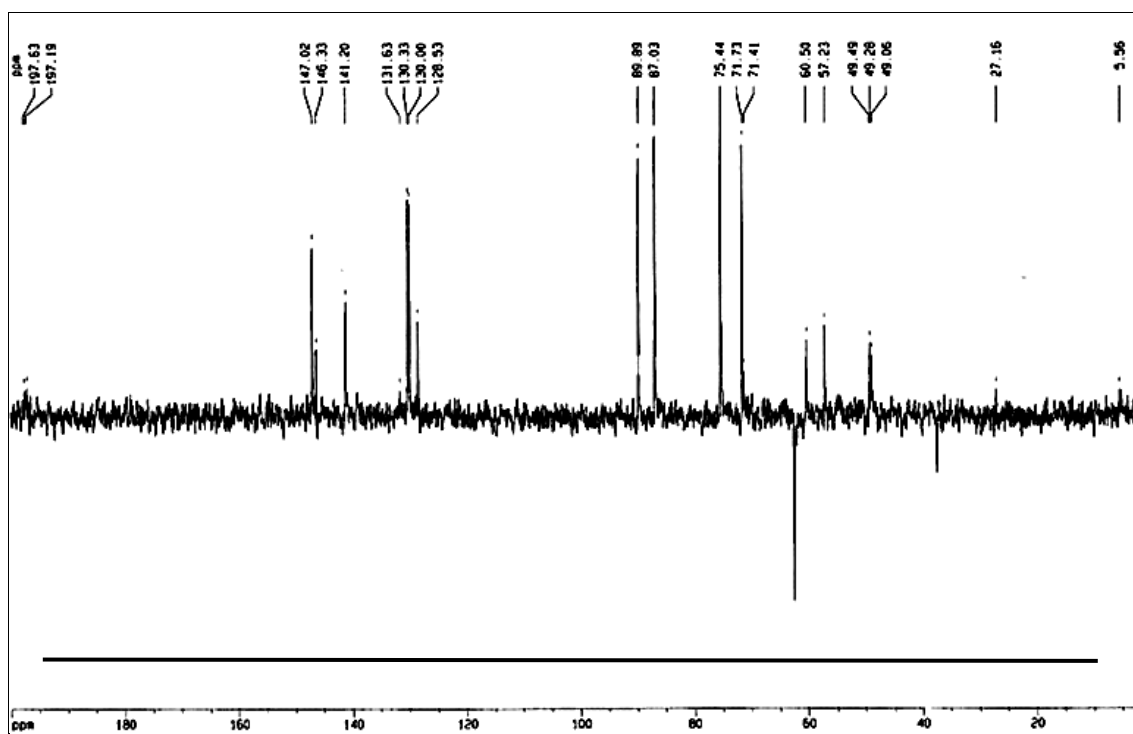


Figura 3.63 - Espectro DEPT da amostra LB5a.

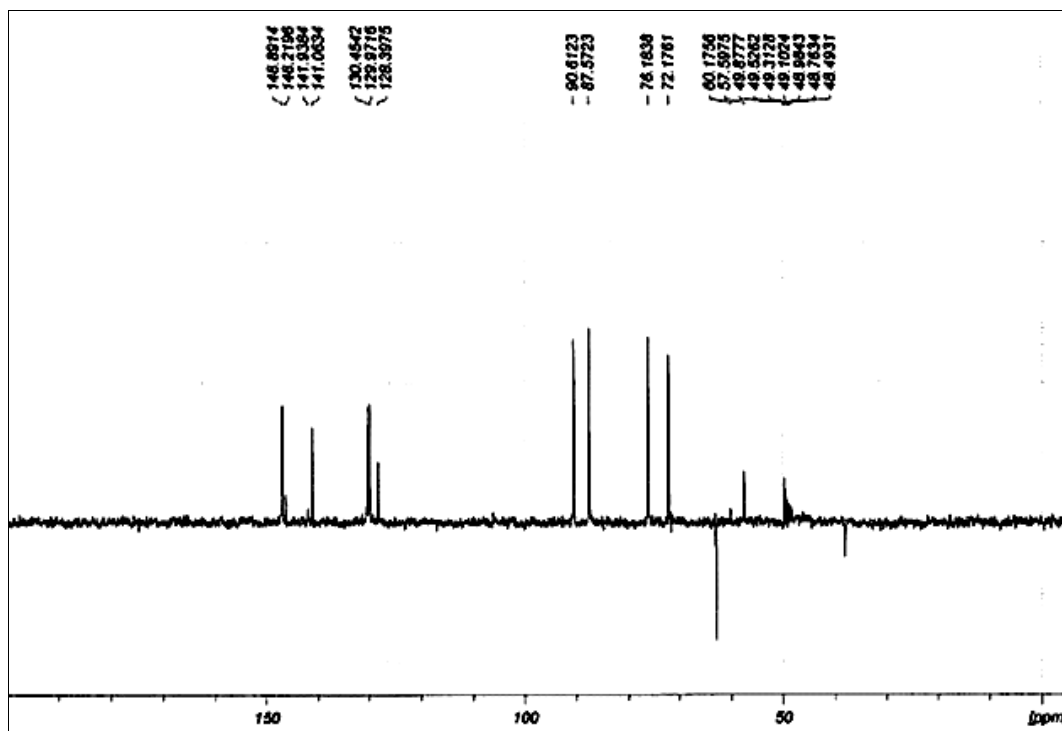


Figura 3.64 - Espectro DEPT da amostra LB4a.

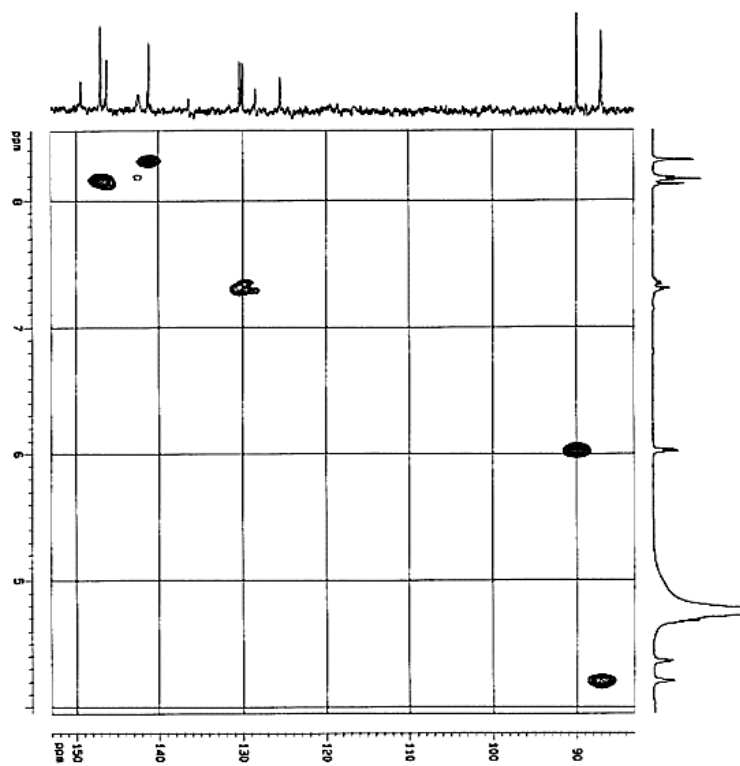


Figura 3.65 - Ampliação do espectro de análise HMQC da amostra LB5a.

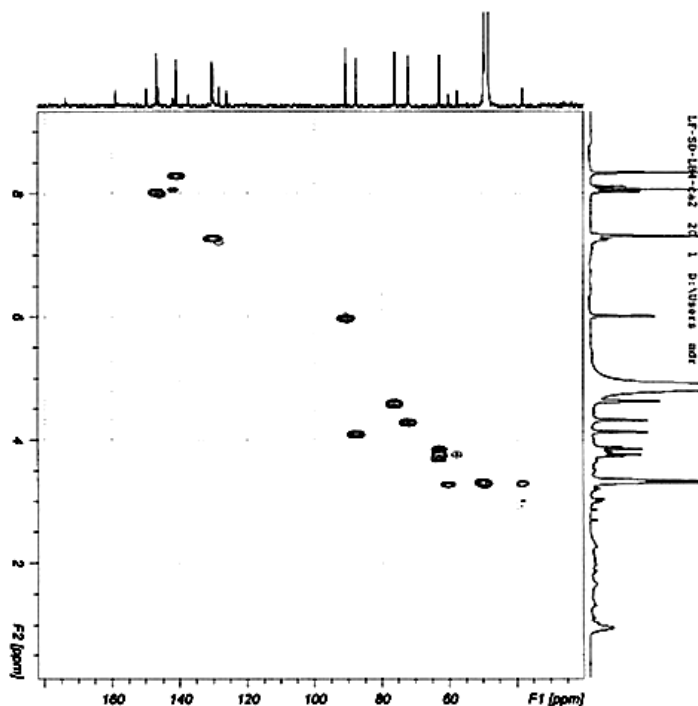


Figura 3.66 - Espectro de análise HMQC da amostra LB4a.

Apesar de terem sido obtidas pequenas quantidades de amostras, não completamente puras, é possível tirar algumas conclusões acerca de um esqueleto estrutural para estes compostos corados.

Pela análise dos resultados obtidos por ^1H RMN, (Figuras 3.59 e 3.60), e espectros de massa dos dois extractos do pigmento (Figuras 3.67 e 3.69), correspondentes às duas amostras analisadas, verifica-se que estas apresentam perfis semelhantes de ^1H RMN com sinais a valores de desvio químico entre 3 e 8,3 ppm, e integrais semelhantes mas diferentes espectros de massa. O facto de os perfis serem semelhantes parece indicar que a formação do pigmento não está dependente do prolongamento da maturação, ocorrendo ainda nas fases de secagem.

Uma vez que a área dos sinais nos espectros de ^1H RMN é directamente proporcional ao número de núcleos de hidrogénio a que diz respeito podemos verificar que:

- Os sinais nos espectros de RMN evidenciam a presença de anéis aromáticos e grupos laterais ligados a átomos de oxigénio. A presença de anéis aromáticos é evidenciada por sinais nos espectros de ^1H RMN entre 7,28 e 8,30 ppm que correlacionam a curta distância (HMQC) com sinais entre 130 e 150 ppm no espectro de ^{13}C RMN. A presença de átomos de oxigénio é evidenciada entre outros aspectos pela existência de um sinal a 6,03 ppm no espectro de ^1H RMN

que correlaciona a curta distância (HMQC) com um sinal a 89 ppm no espectro de ^{13}C RMN além de 4 outros sinais no espectro de ^{13}C RMN acima de 50 ppm, sendo 3 deles de carbonos primários ou terciários e um outro um grupo CH_2 como é possível determinar pela existência do sinal invertido no DEPT.

- b) Não são visíveis sinais devidos a cadeias carbonadas saturadas que exigiriam a presença de sinais nos espectros de ^1H RMN na região 0-2 ppm com uma integração elevada e vários sinais invertidos no espectro de DEPT.

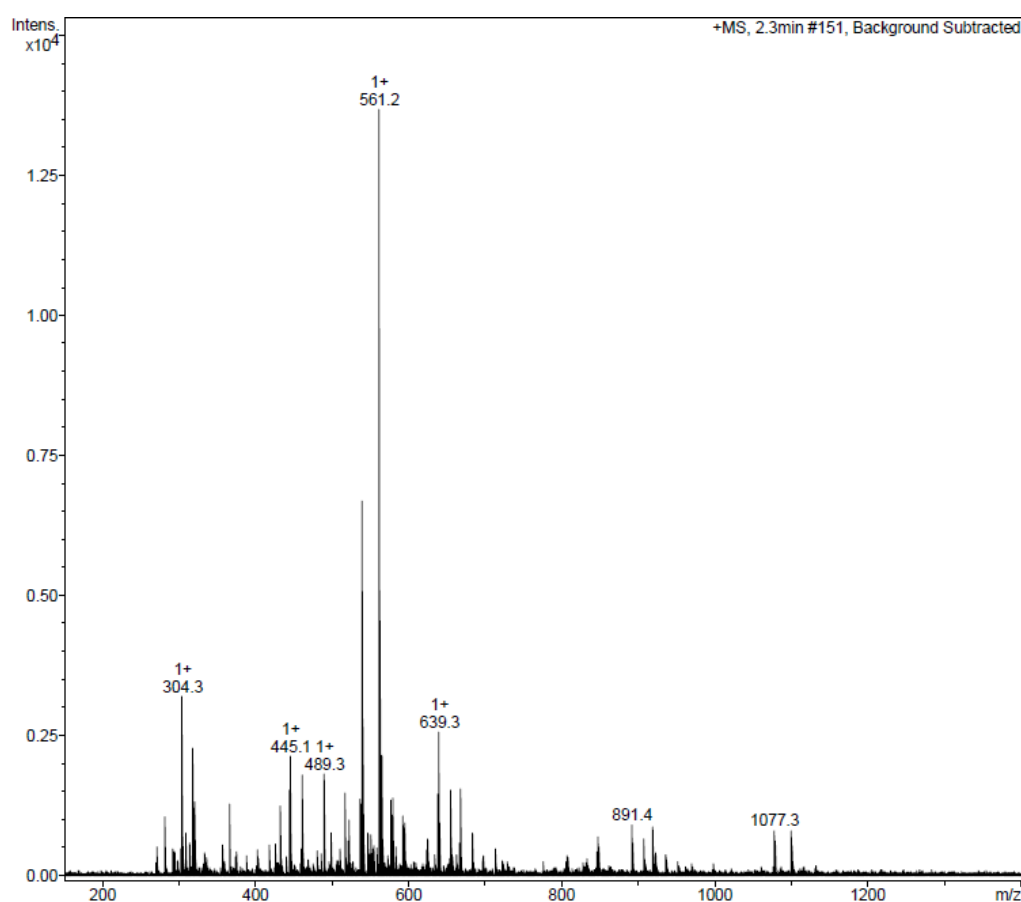


Figura 3.67 – Espectro de massa de LB4A.

Os espectros de massa obtidos por ionização por electrospray (ESI), uma técnica de espectrometria de massa que provoca poucas quebras nas moléculas em estudo, mostra para a amostra LB4A (Figura 3.67), um sinal com uma relação m/z de 639 o que corresponderá a uma estrutura com uma massa molecular de 638 uma (unidade de massa atômica). Este valor é compatível com uma estrutura como a apresentada na Figura 3.68,

que tem como principal incongruência a presença de apenas três átomos de carbono diferentes ligados a hidrogênio e a oxigênio e não quatro como se pode inferir dos espectros mencionados atrás.

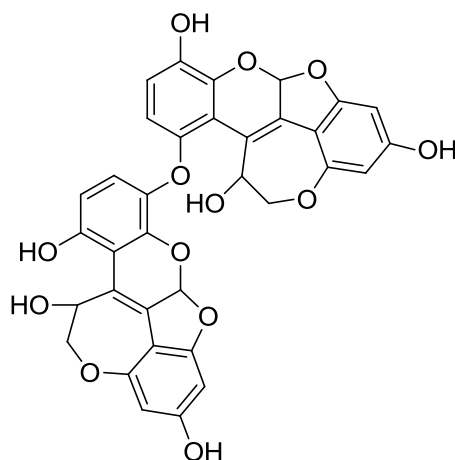


Figura 3.68 - Estrutura proposta para LB4 A.

Já a amostra LB5A apresenta um sinal com uma relação m/z de 635 (Figura 3.69), o que corresponderá a uma estrutura com uma massa molecular de 634 uma.

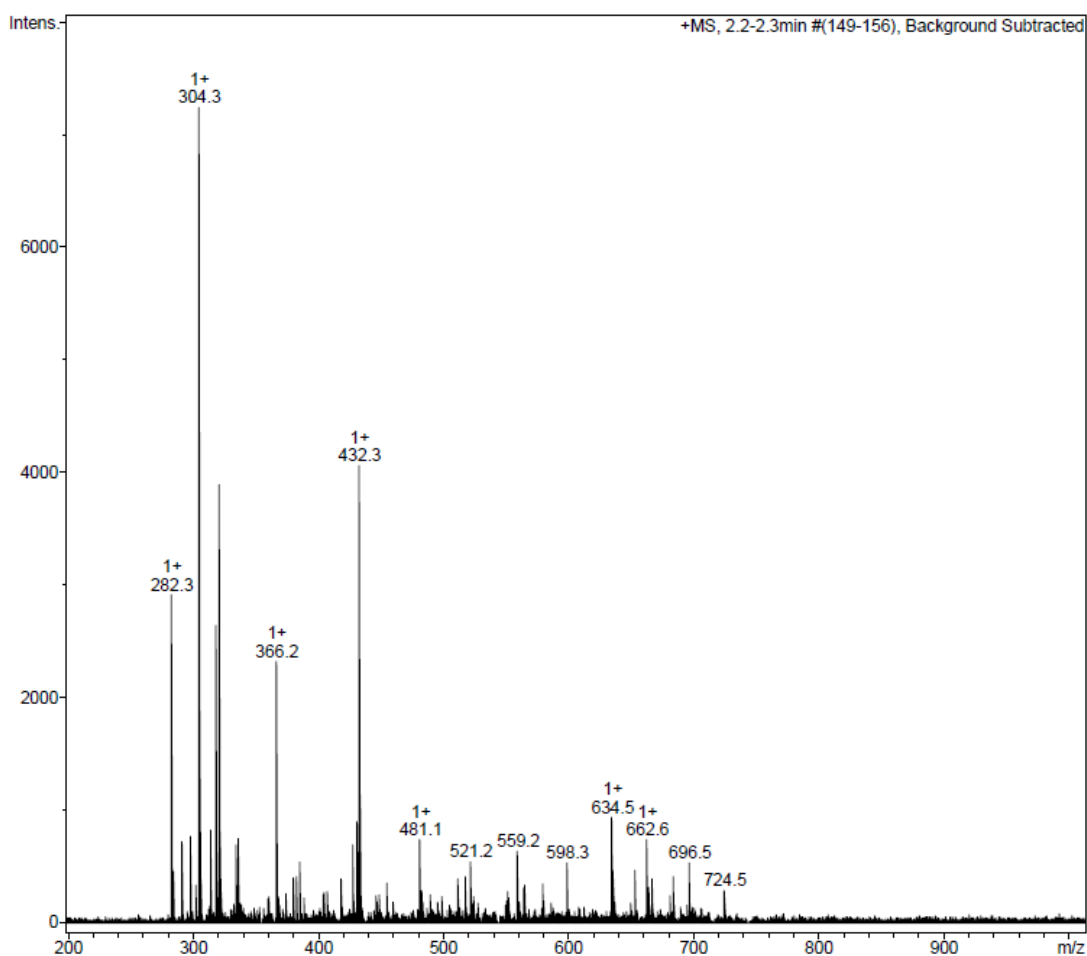


Figura. 3.69 - Espectro de massa de LB5A.

Este valor é compatível com uma estrutura como a apresentada na Figura 3.70, que tem como principal incongruência a falta de grupos hidroxilo livres que lhe deveriam garantir uma polaridade muito inferior à da amostra L4a, o que não sucede na realidade. O isolamento de maiores quantidades destes compostos permitiria a sua identificação estrutural de forma inequívoca.

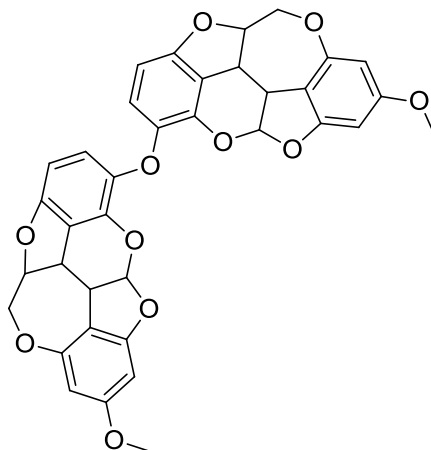


Figura. 3.70 - Estrutura proposta para LB5 A.

Soudan (1955), desenvolveu estudos com vista a esclarecer os mecanismos relacionados com a formação do amarelecimento do bacalhau salgado. De acordo com estes estudos, a autora afirma que, no caso do amarelecimento ao fim de 7, 15 ou 21 dias de armazenamento a 35 °C, 32 ou 29 °C, a tonalidade desenvolve-se mais depressa quando o peixe é fracamente salgado e a temperatura aumenta, parecendo contudo, independente do teor em água do músculo do peixe e da humidade relativa do ar.

Uma reacção do tipo de Maillard, entre os aldeídos de origem lipídica e os grupos amina dos aminoácidos é apontada pela autora como uma possível explicação.

Bjorkevoll *et al.*, (2003), voltam a reforçar que a formação do pigmento amarelo acastanhado é resultado da reacção entre a gordura oxidada e os componentes da fracção proteica.

Como já foi referido anteriormente, os fosfolípidos das membranas das células musculares são muito susceptíveis à oxidação lipídica durante a maturação do peixe, porque contêm ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa e, sendo componentes das membranas, encontram-se em contacto com catalisadores de oxidação lipídica, como ferro e iões de cobre, presentes na fase aquosa da célula muscular (Lauritzsen, 2004)

Os ácidos gordos insaturados C20 e C22, sendo os que se encontram em maiores quantidades nos fosfolípidos do bacalhau fresco, constituem mais de 57% do total de ácidos gordos libertados durante a salga (Cardin, 1958).

Tendo em conta as características dos compostos aromáticos detectados nos perfis RMN das amostras analisadas, as reacções conducentes à formação do pigmento só podem envolver os aminoácidos fenilalanina ou tirosina porque possuem um anel aromático e cadeias laterais com 3 átomos de carbono.

Esta possibilidade também é sustentada pelo facto destes aminoácidos se encontrarem presentes em quantidades significativas no bacalhau salgado. A fenilalanina pode apresentar teores de 4,2 -4,3 g e a tirosina 4,6 -4,75 g , por 100 g de proteína (Ferreira , 1951),

De acordo com Soudan (1955) o composto amarelo foi supostamente reproduzido artificialmente deixando aminoácidos em contacto com o óleo muscular do bacalhau, completo ou sem fosfatídeos. A cor obtida foi mais escura quando se utilizou óleo isento de fosfatídeos, ou seja, particularmente oxidável. Semelhante intensidade da cor foi conseguida com a adição de óxido de trimetilamina, activando deste modo a oxidação.

O óxido de trimetilamina (OTMA), é um constituinte normal dos músculos dos peixes. Após a morte destes é reduzido progressivamente a trimetilamina (TMA) por acção de bactérias anaeróbias facultativas. Com a salga, há uma acumulação de sal sobretudo à superfície, o que leva à interrupção da actividade bacteriana, cessando esta redução da OTMA a TMA. O potencial de oxirredução do sistema fica num nível elevado facilitando a oxidação do óleo muscular (Soudan, 1955).

A zona superficial do peixe, mais rica em OTMA, mais pobre em fosfatídeos e a mais exposta ao ar é aquela onde as proteínas são mais degradadas e a que reúne as condições favoráveis ao amarelecimento, apresentando efectivamente um tom mais intenso que as regiões interiores do peixe. A prensagem do peixe também favorece o amarelecimento ao conduzir à difusão da OTMA do interior para a superfície (Soudan, 1955).

Mais recentemente, Lauritzsen (2004), baseado em trabalhos de (Pokorny, 1981), explica que aldeídos, peróxidos dialdeídos e derivados de decomposição de hidroperóxidos podem reagir com aminas para produzir iminas ou bases de “Shiff” (R-CH=N-R’).

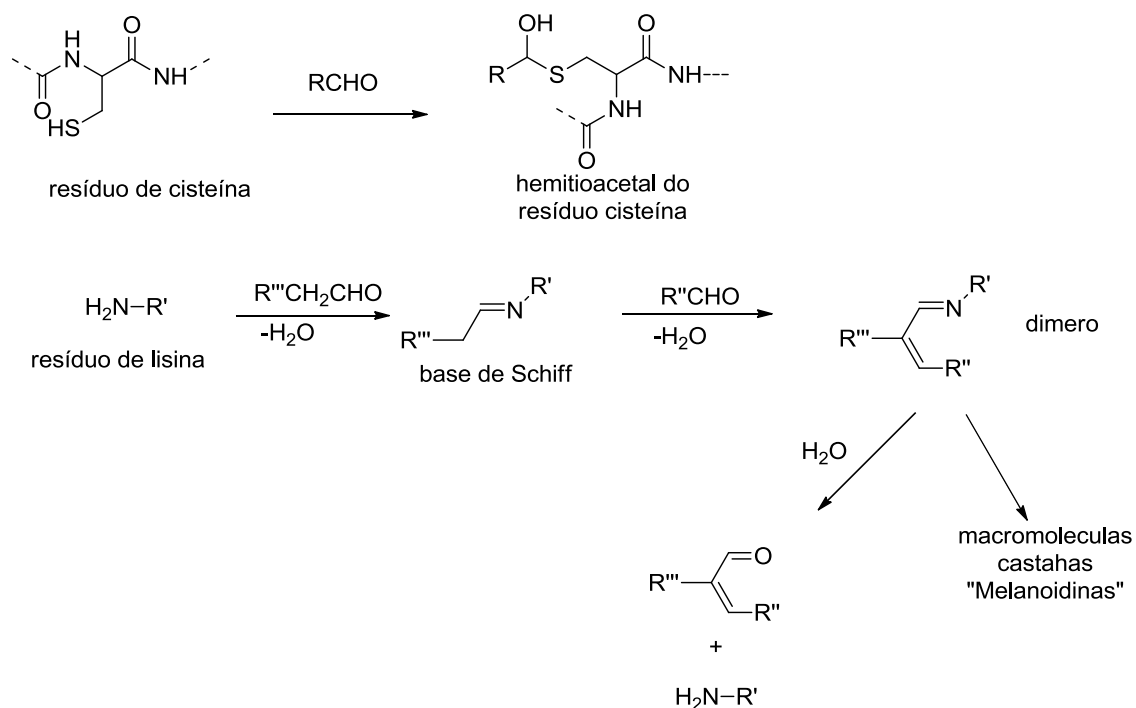


Figura. 3.71 - Produtos de interação entre cisteína e aldeídos, e entre uma base de Schiff e lisina combinado (Adaptado de: Pokorný, 1981).

As bases de “Shiff” polimerizam por condensação aldólica produzindo dímeros e complexas macromoléculas de elevado peso molecular, castanhas, conhecidas como melanóides (Figura 3.71). Estes materiais poliméricos castanhos são instáveis e geram compostos voláteis por novas cisões da macromolécula ou por desidratação, afectando as características de sabor dos alimentos durante a cozedura e/ou processamento.

No presente caso os compostos detectados apesar de poderem envolver na sua biossíntese aminoácidos como a fenilalanina ou a tirosina (unidades C6C3) que perderam o seu átomo de azoto não parecem ser provenientes da reacção destes com cadeias carbonadas longas provenientes de ácidos gordos uma vez que se verifica a ausência de sinais devidos a números elevados de unidades CH₂ nos espectros de ¹H RMN dos compostos isolados.

As unidades C6C3 fenólicas resultantes da desaminação do aminoácido como são facilmente oxidáveis formam radicais livres. As condições que favorecem a oxidação, favorecem a formação de radicais livres muito reactivos que tendem a ligar-se e a formar dímeros ou trímeros, que são mais facilmente corados.

A ligação do aparecimento do pigmento amarelo com a presença dos fosfolípidos no bacalhau (referida na bibliografia) poderá eventualmente resultar destes promoverem um ambiente lipofílico que fomente a reacção de formação do pigmento em desfavor de processos metabólicos favorecidos pelas condições hidrofílicas circundantes e que não levam à formação substância coradas.

As quantidades de amostras de pigmento extraídas do bacalhau, em duas fases do processo de cura, não foram suficientes para obter espectros que permitissem estabelecer inequivocamente a estrutura química do pigmento. No entanto, é possível afirmar que a formação do pigmento amarelo não está dependente do prolongamento da fase de cura, pois já é detectável a seguir à secagem posterior à primeira demolha. Tal facto aponta para uma interferência directa dos microrganismos presentes, cuja actividade sofre um forte incremento com a remoção do sal pela primeira demolha. Tendo em conta que a estrutura do pigmento terá por base aminoácidos como a fenilalanina e/ou a tirosina, é de admitir que a sua formação resulte da actividade de bactérias proteolíticas, nomeadamente do género *Psychrobacter* (Bjorkevoll *et al.*, 2003), cuja actividade foi posta em evidência ao longo deste trabalho, tanto por indicadores microbiológicos como físico-químicos.

Importa ainda referir que alguns dos géneros bacterianos encontrados no bacalhau de cura amarela são conhecidos pela produção directa de pigmentos amarelos, como é o caso do género *Oceanisphaerae*, que exhibe colónias amarelas podendo ocorrer difusão do pigmento no meio, e o género *Kocuria*, também associado à pigmentação amarelo-acastanhado que provoca em certos queijos (Dufossé *et al.*, 2010). Contudo, nestes casos a formação de pigmento resulta em manchas localizadas de cor escura que depreciam o produto alimentar e nada devem ter a ver com a cor amarela uniforme, própria do bacalhau amarelo.

“O desgaste do corpo e da alma ... ao fim de cinco meses no mar da Terra Nova assumiam como que um peso feito de sombras e cansaço cerebral.

Estava ali encostado e descobria que desejava pensar e não sabia como.”

Anselmo Vieira,

Nos Mares da Terra Nova - A Saga dos Bacalhoeiros, 2010

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados experimentais apresentados ao longo desta dissertação tiveram como objectivo fundamental aprofundar o conhecimento da população microbiana presente ao longo do processo de cura amarela do bacalhau, de forma a dar resposta a algumas perguntas formuladas na fase do delineamento experimental desta dissertação e após entrevistas com industriais do sector. À luz de toda a informação que foi possível obter é possível responder satisfatoriamente a algumas dessas perguntas, menos satisfatoriamente a outras e formular novas perguntas que ainda não têm resposta. A título conclusivo apresentam-se, de seguida, as respostas que foi possível encontrar para as perguntas inicialmente formuladas:

1. A cura amarela implica, no todo ou em parte, a actividade microbiana de grupos funcionais microbianos?

Com base nos resultados dos ensaios 2, 3, 4 e 5 é possível afirmar que a cura amarela do bacalhau envolve actividade microbiana, que se traduz na detecção de maiores cargas microbianas do que as presentes no bacalhau de cura branca, por vezes de várias ordens de grandeza, e na medição de alguns parâmetros físico-químicos, cujos valores divergem, de forma significativa, dos relativos à cura branca, nomeadamente pH, teor de ABVT, N-TMA e, por vezes, amins biogénicas.

Embora não tenha sido preocupação deste trabalho identificar a origem dos microrganismos envolvidos no processo de cura, os resultados permitem concluir que, no essencial, a origem é o bacalhau fresco e, conseqüentemente, os habitats em que ele vive. A maior parte dos microrganismos encontram-se na pele, guelras e vísceras do bacalhau. Todo o processo de captura, descabeçamento, evisceração e escala implicam uma contaminação suplementar e fortuita, que concorre para o enriquecimento da diversidade microbiana presente no peixe, particularmente no que respeita a bactérias Gram -. Esta contaminação acidental justifica que o bacalhau apresente, como o presente estudo demonstrou, espécies do género *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Flavobacterium*, comumente isoladas a partir do “slime” superficial do bacalhau fresco e *Proteobacterium* spp., comum em sedimentos marinhos. A salga, a que o bacalhau é sujeito é decisiva na biodiversidade da microbiota do bacalhau curado, pois a elevada concentração de sal condiciona o desenvolvimento de parte da microbiota natural ou de contaminação fortuita

durante a captura e evisceração, inibindo a actividade de muitos grupos microbianos, que deixam de se multiplicar, mas permanecem no bacalhau. Por essa razão, os grupos mais resistentes ao sal, baixo a_w e baixa humidade são os que prevalecem e desenvolvem actividade sempre que as condições ambientais o permitem, nomeadamente durante e após as demolhas.

2. Em caso de resposta afirmativa à primeira pergunta, qual ou quais os grupos funcionais envolvidos?

Os grupos funcionais envolvidos no processo de cura são, essencialmente, as bactérias proteolíticas, as produtoras de N-TMA, as amonificantes e, em determinadas condições, as produtoras de aminas biogénicas. As bactérias proteolíticas dominantes parecem ser as pertencentes ao género *Psychrobacter*, que parecem estar activas ao longo de todo o processo de cura desde a primeira demolha. As bactérias produtoras de N-TMA dominantes parecem ser as dos géneros *Psychrobacter*, *Alcaligenes* e *Staphylococcus*, que se caracterizam por produções fracas de TMA, quando comparadas com as espécies fortemente produtoras, como *Shewanella putrefaciens* e *Photobacterium phosphoreum*, que só actuam na presença de baixos teores de sal. As estirpes do género *Staphylococcus* parecem ser as principais candidatas à deterioração do produto final, com formação de reima e odor desagradável, quando as condições de armazenagem não são as apropriadas. No que respeita ao envolvimento de bactérias amonificantes no processo de cura constatou-se a sua actividade, pois foram detectadas no meio diferencial utilizado, com pesquisa do ião amónio, mas como não foi possível isolá-las a partir desse meio, não se conseguiram identificar os géneros ou espécies dominantes.

As amostras de bacalhau demolido revelaram uma diversidade de grupos microbianos superior às das amostras de peixe salgado verde ou depois das secagens, sugerindo que, com o aumento da humidade do alimento e remoção de sal, muitos grupos bacterianos são mais facilmente recuperados, multiplicam-se e são, portanto, detectados pelos métodos microbiológicos clássicos. Com a diminuição da concentração do sal, observou-se um incremento (cerca de cem vezes) do grupo das bactérias proteolíticas, na fase pós demolha e na fase de secagem subsequente, confirmando-se que a redução da concentração de sal estimula a actividade microbiana, essencialmente proteolítica. Esta actividade proteolítica conduz ao aumento de azoto não proteico, permitindo numa fase posterior a formação de compostos fundamentais para a síntese de substâncias químicas ligadas às características sensoriais do produto final, nomeadamente a cor. Esta forte actividade microbiana também

conduziu ao aumento do pH do bacalhau, que sugere a produção de NH_3 e confirma a actividade dos amonificantes.

3. A cura amarela permite obter um produto final com características comerciais e/ou organolépticas superiores ao de cura branca?

Antes de se iniciar o trabalho experimental conducente a esta dissertação já se sabia que o bacalhau de cura amarela era inequivocamente diferente do bacalhau de cura branca, como os nomes de cada um indicam e o reconhecimento comercial do amarelo demonstra. O que interessava provar era se o aroma e o sabor do bacalhau amarelo eram melhores do que os do bacalhau branco, a ponto de justificar uma grande diferença de preço no mercado, a preferência dos gastrónomos e a crença popular de que o amarelo é superior. E neste aspecto os resultados desta dissertação podem considerar-se algo decepcionantes, pois a análise sensorial efectuada demonstrou que não há diferenças relevantes entre uma posta cozida de bacalhau de cura amarela e uma de bacalhau de cura branca, mesmo na cor, textura, forma como lascam e, provavelmente, untuosidade e fibrosidade.

Importa, ainda, salientar que com base na análise sensorial, o prolongamento do tempo de maturação do bacalhau de cura amarela não se traduziu num apuramento das características organolépticas, pelo que a indústria não tem vantagem em apostar no prolongamento do período de maturação. Tal opção não se revela numa melhoria comercial e sensorial do produto. Por outro lado, acarreta aumento dos custos de manutenção, pois implica um maior controlo da temperatura ambiente (que não deve ser superior a 7°C, mesmo que a humidade ambiente seja inferior a 70%), de forma a evitar a alteração do alimento, que pode conduzir à rejeição por parte do consumidor.

Há que reconhecer, no entanto, que os resultados obtidos podem não ser definitivos, dado que há muitas variantes do processo de cura, como se constatou nas empresas L e R, que poderão influenciar mais profundamente as características organolépticas do bacalhau.

4. O bacalhau de cura amarela envolve riscos para a saúde do consumidor, nomeadamente pela presença de aminas biogénicas e ou presença de espécies patogénicas?

Tendo por base todos os resultados obtidos pode-se concluir que, se forem respeitadas as boas práticas fabris e de confecção, nomeadamente a demolha, o bacalhau de cura amarela não constitui um risco para a saúde do consumidor. Há, no entanto, dois aspectos de índole microbiológica que importa pormenorizar: 1) a eventual presença de aminas biogénicas no

produto final e 2) a presença de estirpes patogénicas de *Staphylococcus aureus* e, principalmente, as suas toxinas no produto final.

Em relação ao primeiro aspecto a principal amina biogénica que poderia levantar problemas de saúde pública é a histamina, cujo critério de segurança alimentar legislado – 400 mg/kg, segundo Regulamento CE N°1441/2007 – é muito superior aos teores encontrados neste estudo. Com efeito, só foi detectada histamina em três amostras de bacalhau, ao longo do processo de cura, cujos valores foram de 6,1, 5,2 e 21,9 mg /kg, sendo o valor mais alto obtido numa amostra em que o bacalhau se encontrava já em processo de putrefacção. Esta última constatação permite concluir que, em condições normais, não é previsível a presença de teores elevados de histamina no produto final, pelo que, após a demolha, será altamente improvável o risco para os consumidores.

Em relação ao segundo aspecto, importa referir que das 95 estirpes identificadas neste estudo, nenhuma foi identificada como uma espécie microbiana patogénica. Além disso, importa salientar que, apesar de se indicar apenas a identificação até ao nível de género, foi possível em muitos casos fazer identificação até ao nível de espécie (Tabela 1 do Anexo III) e no caso concreto do género *Staphylococcus*, nenhuma espécie foi identificada como *Staphylococcus aureus*. Sabendo que as enterotoxinas estafilocócicas são produzidas durante o crescimento e altamente resistentes ao calor, poderiam constituir um perigo se ocorressem no produto final. Todavia, não há, ao que julgamos saber, referências à sua presença no bacalhau de cura amarela, contribuindo para tal situação a raridade de ocorrência e de crescimento de *St. aureus*, o elevado teor de sal, que contraria a produção das toxinas pelas bactérias, e a baixa temperatura a que o peixe deve ser armazenado. Importa ainda sublinhar que de acordo com a bibliografia a presença de *S. aureus* nos alimentos é sobretudo resultado da manipulação (ICMSF, 1988).

5. A pigmentação amarela do bacalhau resulta, directa ou indirectamente, da actividade microbiana?

Os aminoácidos livres, resultantes da intensa actividade proteolítica durante e após as demolhas, parecem estar envolvidos na formação do pigmento, característico do bacalhau de cura amarela. Esta formação manifesta-se ainda nas fases de secagem, não estando dependente do prolongamento da maturação. A cor amarela âmbar é, assim, uma consequência indirecta da actividade microbiana que ocorre durante a cura do bacalhau, que, devido à diminuição do teor de sal, favorece a produção de aminoácidos aromáticos, pelos proteolíticos, necessários à síntese das moléculas coradas. Os resultados obtidos

apontam, ainda, para que os ácidos gordos das membranas celulares, propostos por vários autores como os fornecedores das cadeias carbonadas para completar a estrutura do(s) pigmento(s) amarelo(s), não estejam envolvidos. Trabalho adicional é necessário para esclarecer definitivamente o assunto e para saber se os pigmentos amarelos de alguns queijos com teores de sal análogos ao do bacalhau amarelo têm o mesmo ou similar mecanismo de formação.

6. Qual a natureza química do pigmento amarelo?

Quanto à composição química do pigmento os espectros de RMN evidenciaram a presença de anéis aromáticos e grupos laterais ligados a átomos de oxigênio, sugerindo que os aminoácidos fenilalanina ou tirosina (unidades C6C3) são os que podem estar envolvidos. Contudo, os compostos detectados, apesar de poderem envolver na sua biossíntese estes aminoácidos, não parecem ser provenientes da reação destes com cadeias carbonadas longas, provenientes de ácidos gordos, como tem sido sustentado por alguns autores.

O estatuto comercial que tem o bacalhau de cura amarela e o valor acrescentado que ele representa relativamente ao bacalhau de cura branca continuam a justificar mais estudos de base científica, que permitam habilitar a indústria a produzir este tipo de bacalhau de forma perfeitamente controlada. Nesse sentido e com base na experiência que foi o trabalho de preparação desta dissertação, é possível formular algumas perguntas cujas respostas contribuiriam para um melhor conhecimento deste tipo de bacalhau: 1) qual a estrutura química do ou dos pigmentos que conduzem à coloração amarela do bacalhau? 2) Será possível intervir a nível do processo para otimizar a produção do pigmento amarelo? 3) Que indicadores físico-químicos serão mais adequados e expeditos para controlar o processo industrial da cura amarela? 4) O recurso a culturas de arranque permitiriam controlar mais eficazmente a proteólise? 5) Será possível desenvolver novos meios de cultura que permitam pôr em evidência novos grupos funcionais de microrganismos? 6) O recurso à pirosequenciação das amostras positivas dos tubos múltiplos permitirá um melhor conhecimento da microbiota dominante ao longo do processo de cura?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. BIBLIOGRAFIA

- AIB, (2010). Caderno de especificações e obrigações do produto - bacalhau de cura tradicional portuguesa. Versão remetida para análise na CE. (Fevereiro): 11 p.
- Andrés, A., Rodríguez-Barona, S., Barat, J. M., e Fito, P. (2005). Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics. *J Food Engi.* 69:467-471.
- Austin, B. (2006). The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Sci World J.* 6: 931–945.
- Aveiro, V. (2009). Histórias Desconhecidas dos Grandes Trabalhadores do Mar – Recordações da Pesca do Bacalhau (3ª ed.). Editorial Futura. Lisboa. 228 p
- Aviso nº 15 094/2007 do DR 2ª série, nº 159 – 20 Agosto de 2007 23819 p
- Baek, S., Im, W., Oh, H., Lee, J., Oh, H., e Lee, S. (2006). *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J System Evol Microbiol.* 56 (Pt 11): 2665-2669.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., N.Chistiansen, J., Johansen, C., e Gram, L. (2003). Th emicrobial ecology of processing equipment in differet fish industries - analysis of the microflora during processig and following cleaning and disinfection. *Int J Food Microbiol.* 87: 239-250.
- Barat, M. J., Gallart-Jornet, L., Andrés, A., Akse, L., Carlehog, M., e Skjerdal, O. (2006). Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. *J Food Engin.* 73: 9-19.
- Barat, M. J., Rodríguez-Barona S., Andrés, A., e Fito, P. (2002). Influence of increasing brine concentration in the cod sating process. *J Food Sci.* 65(7): 1922-1925.
- Barat, M. J., Rodríguez-Barona S., Andrés, A., e Fito, P. (2003). Cod salting manufacturing analysis. *Food Res.* 36: 447-453.
- Barat, J. M., Rodríguez-Barona, S., Andrés, A., e Visquert, M. (2004). Mass transfer analysis during the cod desalting process. *Food Res Inter.* 37: 203-208.
- Batista, I. ; Nunes, M. L. (1993). Salga e seca de peixe, um guia prático Instituto Nacional de investigação das pescas. Publicações avulsas INIP. Lisboa. (Vol. 22): 35 p.
- Batista, I., Nunes, M. L., Bandarra, N. M. (2008). Consumos e principais características dos produtos da pesca. *In: Produtos da Pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores.* M. L. Nunes, I. Batista, N. M. Bandarra, M. d. Morais, & P. O. Rodrigues, (Edits.). Lisboa: IPIMAR. (Vol. 18):77 p.

-
- Baxter, R., Gibbons, N. E. (1957). The cysteine desulphhydrase of *Pseudomonas salinaria*. *Can J Microbiol.* 3(3): 461-465.
- Beatty, S. A., Fougère, H. (1957). The processing of dried salted fish. *J Fish Res Board Can.* 112: 54 p
- Bergey's. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). P. H. Editor, & M. N. Editors (Edits.). Willians e Wilkins. Baltimore USA. pp. 965-1599
- Bilinski, e Fougère, H. (1959). The effect of sodium chloride on proteolysis and on the fate of aminoacids present in the muscle of codfish (*Gadus callarias*). *J Fish Res Board Can.* 16 (5): 747-754.
- Bjorkevoll, I., Ragner, L., e Skjerdal, O. (2003). Origin and Spoilage potential of the microbiota dominating genus *Psychrobacter* in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus morhua*). *Inter J Food Microbiol.* 84:175-187.
- Blesa, E., Aliño, M., Barat, J., Grau, R., Toldra, F., e Pagán, M. (2007). Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Meat Sci.*:1-8.
- Botelho, T. (1948). Preparação do bacalhau nos secadouros. Conclusão. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de pesca*, , ano XV, Nº 20 (Setembro): 29-39.
- Botelho, T. (1952). Preparação do bacalhau. Alguns aspectos técnicos e económicos. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, ano IX, Nº35 (Junho): 71-77.
- Botelho, T. (1953a). Outros Aspectos da preparação do bacalhau em secadouros nacionais. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, ano X, Nº 38 (Março):113-120.
- Botelho, T. (1953b). Preparação do bacalhau a bordo dos navios de pesca. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de pesca*, Ano X, Nº39 (Junho): 59-77.
- Botelho, T. (1954). A salga do bacalhau. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, Ano XI, Nº 45 (Dezembro): 105-124.
- Botelho, T. (1958a). Aspectos tecnológicos da preparação de bacalhau desde a captura à secagem (elementos históricos). (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, Ano XI, Nº59 (Junho): 11-37.
- Botelho, T. (1958b). Aspectos tecnológicos da preparação de bacalhau desde a captura à secagem (preparação a bordo dos lugres portugueses). (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, Ano XI, Nº61 (Dezembro):11-39.
- Botelho, T. (1965a). Pescado seco e salgado. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de pesca*,ano XVI, Nº 87 (Setembro): 41-63.
- Botelho, T. (1965b). Pescado seco e salgado (continuação do número anterior). (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, Ano XVI, Nº88 (Setembro): 55-81.
-

-
- Boury, M. (1932). Recherches sur la morue salée. *Recherches Techniques. Revue des Travaux de l'office des pêches maritimes*. 17, V Fasc.I: pp. 297-313.
- Boury, M. (1934). Études sur le salage du poisson. *Revue des travaux de l'office des pêches maritimes*. 7: 195-222.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, C. (1999). Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* on biogenic amine fermentation during the ripening of dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol*. 46, 2 (fevereiro): 95-104.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, C. (2001). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic *Staphylococcus* on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *Int J Food Microbiol*. (Abril) 65 (1-2): 113-123.
- Bozal, N., M., M. J., Tudela, E., & Guinea, J. (2003). Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozzi* sp. nov. *Int J Syst and Evol Microbiol*. 53 (nº4): 1093-1100.
- Broekaert, K., Nosedá, B., Heyndrickx, M., Vlaemynck, G., e Devlieghere, F. (2012). Volatile compounds associated with *Psychrobacter* spp. and *Pseudoalteromonas* spp., the dominant microbiota of brown shrimp (*Crangon crangon*) during aerobic storage. In K. Broekaert: *Molecular identification of the dominant microbiota and their spoilage potential of Crangon crangon and Raja sp.* pp. 76-92.
- Cahill, M. M. (1990). Bacterial Flora of Fishes: a Review. *Microbial Ecology*. 19: 21-41.
- Canas, A. J. (2001). A pesca do bacalhau nos séculos XVII e XVIII, Franceses, ingleses e americanos disputam a Terra Nova. J. A. Henrique Viana, (Ed.) *Oceanos - Terra Nova. A epopeia do bacalhau*. 45 (Janeiro/Março): 65-74.
- Cardin, A., Bordeleau, M., & Laframboise, A. (1958). The composition of the Fatty Acids Liberated from the Phospholipids in the Preparation of Salted Codfish. *Fish Res Board Can*. 15 (4): 555-558
- Carneiro, A. R., Ramos, R. T., Dall'Agnol, H., Pinto, A. C., C. Soares, S., Santos, A. R., et al. (2012). Genome Sequence of *Exiguobacterium antarcticum* B7, Isolated from a Biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica. *J Bacteriol*. 194 (23) Dezembro: 6689-6690.
- Castell, C., Richards, J., e Wilmot, I. (1949). *Pseudomonas putrefaciens* from Cod Fillets. *J. Fish Res Board of Can*. 7 (7): 430-431.
- Castro, O. (1946). Breves referências sobre a tecnologia da preparação do bacalhau. J. d. Lemos (Ed.) *Boletim de Pesca*. 11: 3-31.
- Castro, O. (1958). Experiências de Cura Amarela do Bacalhau e seu possível interesse na secagem de peixe para climas quentes. *V congresso Nacional de Pesca Angola*. Angola.
-

-
- Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., et al. (2007). Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *Inter J Food Microbiol.* 116: 52-63.
- Chaves, S. (2005). *Diversidade de procariontas sulfato-redutores e desnitrificantes em amostras ambientais*. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Lisboa.
- Correia, T. A. (1950). A pesca do bacalhau e a economia nacional. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*. Ano VII, Nº28 (Dezembro): 3-24.
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and Quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Inter J Food Microbiol.* 26:319-333.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kampermann, L., Neumeye, K., McMeekin, T. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Inter J Food Microbiol.* 23:391-404.
- Davis, P. A., Babel, F. J. (1953). Slime formation on cottage cheese. *Purdue Agric Exper Station J.* 736:176-184.
- Debevere, J., e Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *Inter J Food Microbiol.* 31: 221-229.
- Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de Janeiro (2005). Determinação do Teor de Cloretos em Bacalhau e Espécies Afins Salgadas, Verdes, Semi-secas ou Secas. DR N.º 20, I Série A: 696-703.
- Denis, C., Irlinger, F. (2007). *Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses*. (Obtido de doi:10,1016/j.ijfoodmicro.2007.08.018).
- Dias, F., Filipe, C. J., Guia, F., R., M., e Vivelinda, G. (2001). A saga do “Fiel Amigo”: As Industrias Portuguesas do bacalhau. *Global Economics and Management*. 1.
- Duarte, F. C. (1999). A aventura do Bacalhau, Um milénio de História - 1ª Parte - Das origens à criação da CRCB. *TecniPeixe - Revista técnica de informação do sector das pescas*. Nº3: 23-29
- Duarte, F. C. (2000). A aventura do Bacalhau, Um milénio de História - 2ª Parte - A dependência da importação. Uma realidade continuamente presente. *TecniPeixe - Revista Técnica de informação do Sector das Pescas*. Nº4(Julho): 31-38
- Duarte, F. C. (2001). As secas de bacalhau, ontem e hoje. In: Garrido, *A pesca do Bacalhau História e Memória*. Lisboa: Editorial Notícias. 349-364
- Duerr, J. D., e Dyer, W. J. (1952). Proteins in fish muscle IV Denaturation by salt. *J Fish Res Board Can.* 8 (5): 325-331.
-

-
- Dufossé L., P. Mabon, e Binet, A. (2001). Assessment of the coloring strength of *Brevibacterium linens* strains: spectrophotometry versus total carotenoid extraction/quantification. *J Dairy Sci.* 84: 354-360.
- Dufossé, L., Valla, A., e Galaup, P. (2010). *Arthrobacter* sp., the bacterial target for a better understanding of color development at the surface of cheeses. Comunicação pessoal no IoFost. 2010. Cape Town. South Africa.
- Dussault, H. P. (1953). Bacteriology of light salted fish-sliming. *J Fish Res Board Can. Progr. Repts. Atlantic Coast Stas.* 55: 3-7.
- Dussault, H. P. (1958). The salt tolerance of bacteria from lightly salted fish. *Proceedings Inter. Symposium Food Microbiol. 2nd Symposium.* Cambridge, England. pp. 61-67
- Dussault, H. P. (1962). Enumeration of Coliform Bacteria in Light Salted Fish Brines. *J Fish Res Board Can.* 19(3):437-444.
- Dyer, F. (1947). Microorganisms from Atlantic Cod. *J Fish Res Board Can.* 7 (3): 128-136.
- Dyer, W. J., & Gunnarsson, G. K. (1954). Trace Elements and Yellow Coloration in Salt Fish. *Atlantic Fish Experimental Station.* 141: 3-4.
- Esaiassen, M., Nilsen, H., Joensen, S., Skjerdal, Carlehog, M., Eilertsen, G., *et al.* (2004). Effects of catching methods on quality changes during storage of cod (*Gadus morhua*). *Lebensm.-Wiss. u.- Technology.* 37: 643-648.
- FAO. (1989). Yield and nutritional value of the commercially more important fish species. *FAO Fisheries Technical Papers*, 309, 187 p.
- Favier, J. C., Ireland, J. R., Toque, C., Feinberg, M. (1995). *Répertoire général des aliments - Table de composition.* INRA Editions. Paris. França. 928 p
- Fernández-Segovia, I., Escriche, I., Fuentes, A., Serra, J. A. (2007). Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods. *Inter J Food Microbiol.* 116: 64-72.
- Ferraro, V., Cruz, I., Jorge, R., Malcata, F. X., Castro, P., e Pintado, M. (2011). Characterisation of high added value compounds in wastewater throughout the salting process of codfish (*Gadus morhua*). *Food Chem.* 124(4): 1363-1368.
- Ferreira A. G. (1951). Composição e Valor Alimentar de Algumas Espécies de Peixe. (J. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca, Ano VIII* 33(Dezembro): 89-101.
- Ferreira A. G. (1953). *Contribuição para o estudo químico do bacalhau.* Lisboa: Ministério da Economia. CRCB.
- Filipe, S. S. (1999). A indústria de salga e secagem do bacalhau: decadência, estagnação ou desenvolvimento?. Tese de Mestrado em Gestão de Empresas. Lisboa: 219 p
-

-
- Fougère, H. (1952). Some considerations on heavy salted pickle fish. *Fish Res Board Can. Progr. Repts. Atlantic Coast Stas.* 52: 15-17.
- FranK, H. A., Baranowski, J. D., Chongsiriwatan, M., Brust, P. A., Premaratne, R. J. (1985). Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from mahimahi (*Coryphaena hippurus*) after incubation at 0 and 32 °C. *Int J Food Microbiol.* 2: 331-340.
- Frazier, W. C., e Westhoff, D. C. (1988). Preservation by use of low temperatures. In E. Dollinger, *Food Microbiology* (4th ed.). McGraw-Hill Book. Singapore: pp. 121-123
- Freixo, J. (1947). Secagem natural do bacalhau. (A. Herdeiro, Ed.) *Boletim de Pesca*, Ano IV, N°16 (Setembro): 3-11.
- Freixo, J. (1956). Acção dos agentes fisico-quimicos nas bactérias responsáveis pelo rouge. *Conservas de peixe.* 10 (119): 23-25.
- Gallart-Jornet, L., J. M. Barat, T. Rustad, Erikson, U., Escriche, I., P. Fito. (2007a). A comparative study of brine salting of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Food Engin.* 79: 261-270.
- Gallart-Jornet, L., J. M. Barat, T. Rustad, Erikson, U., Escriche, I., P. Fito. (2007b). Influence of brine concentration on Atlantic salmon fillet salting. *J Food Engin.* 80: 267-275.
- Garcia-Lopez, M., Maradona L. M. (2000). *Psychrobacter*. In: Robinson, R. K., C. A. Batt P. D. Patel (Hrsg.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press London. UK. pp 1875-1882.
- Garrido, A. (2001). O Estado Novo e a frota bacalhoeira. Economia e política da pesca à linha. *Oceanos. Terra Nova. A epopeia do bacalhau.* 45 (Janeiro/Março): 90-106.
- Garrido, A. (2011). *A epopeia do bacalhau.* (C. d. Correios, Ed.) Lisboa. 168 p
- Glaeser, E., Klug, G. (2005). Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes . *Microbiology*, 151 (no. 6): 1927-1938.
- Gonçalves, A. M. (2001). Navios com História. Lugres do gelo, cisnes dos oceanos. (H. Viana, J. Amaral, & M. J. Camacho, Edits.) *Oceanos. Terra Nova. A epopeia do bacalhau.* 45 (Janeiro/Março): 154-175.
- Gonçalves, S. M. (2011). *Bacalhau salgado seco: influência da demolha e do tratamento culinário na sua qualidade.* Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa., Lisboa.140 p
- Gonzalez, C., Encinas, J., Garcia-Lopez, M., Otero, A. (2000). Characterization and Identification of Lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiol.* 17: 383-391.
-

-
- Gram, L., Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Inter. J Food Microbiol.* 33: 121-137.
- Gram, L., Sjøgaard, H. (1985). The potentiality of microcalorimetry as a rapid method for monitoring the microbiological quality of raw meat and fish. *Thermochimica Acta.* 95 (2) Novembro: 375-381.
- Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Schuetze, B., Augsten, K., Stackebrandt, E. (2001). *Ornithinimicrobium humiphilum* gen. nov., sp. nov., a novel soil actinomycete with L-ornithine in the peptidoglycan. *Inter J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 1): 81-87.
- Hernández-Herrero, M., Roig-Sagués, A. X., Rodriguez-Jerez, J., Mora-Ventura, M. T. (1999). Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies. *J Food Protec.* 62 (5): 509-514.
- Horne, J. (2001). *Some Notes of Fish Handling and Processing.* Torry Advisory Department of Trade and Industry. Torry Research Station. Note n° 50
- Huey, B., Hall, J. (1989). Hypervariable DNA. Fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J Bacteriol.* 171, 2528–2532.
- Huss, H. H. (1994). Assurance of seafood quality. *FAO Fisheries Paper.* 334. 169 p.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish Tech Paper,* 348. Rome. 195 p
- Huss, H. H., Valdimarsson, G. (1990). Microbiology of salted fish. *FAO. Fish Tech News.* 10 (1): 1-2.
- Hutchings, J. A. (2000). Collapse and recovery of marine fishes. *Nature.* 406 (Agosto): 882-885.
- ICMSF. (1988). Food-borne disease bacteria.. In: Elliott, R. P., Clark, D. S., Lewis K. H., Lundbeck, H., Olsen Jr. B. (Eds), Simonsen. *Microorganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration Vol. I,* University of Toronto Press, Toronto pp:15-51.
- Im, W., Q.M., L., Lee, K., Kim, S., Lee, S., Yi, T. (2010). *Variovorax ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(Pt 7): 1565-1569.
- INE. (2010). *Balança Alimentar Portuguesa 2003-2008.* Destaque, Informação à Comunicação Social. Instituto Nacional Estatística. (Novembro). Portugal. 12 p.
- INE. (2011). *Estatísticas da Pesca 2010.* Instituto Nacional Estatística. Destaque, Informação à Comunicação Social. Instituto Nacional Estatística. (Julho). Portugal. 5 p.
- INSA. (2006). *Tabela de composição de alimentos.* Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Centro de Segurança Alimentar e Nutrição INSA. Lisboa.
-

-
- IPQ. (2009a). NP2282:Determinação da humidade. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.7 p.
- IPQ. (2009b). NP2930:Determinação do teor de azoto básico volátil total (A.B.V.T.). Instituto Português da Qualidade Lisboa. 9 p.
- IPQ. (2009c). NP1841-1:Determinação do teor de azoto de trimetilamina (N-T.M.A.) Parte 1: Método de Conway. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. 9 p.
- IPQ. (2009d). NP1972:Determinação do teor de matéria gorda livre. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.7 p.
- IPQ. (2009e). NP2032:Determinação do teor de cinza total. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. 7 p.
- IPQ. (2009f). NP4490:Determinação do teor de histamina. Instituto Português da qualidade. Lisboa. 9 p.
- Ishikawa M, T. S.-K. (2009). Alkalibacterium thalassium sp. nov., Alkalibacterium pelagium sp. nov., Alkalibacterium putridalgalicola sp. nov. and Alkalibacterium kapii sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted. *Inter J System Evol Microbiol.* 59 (Pt5): 1215-1226.
- Janda, M. J., Abbott, S. L. (September de 2007). Minireview 16S r RNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *J clinic Microbiol.* pp. 2761-2764.
- Jarvis, N. (1950). Curing of fishery products. *U.S. Fish Wildlife Ser.Res Rept, Rept.18,* 271 p.
- Jason, A. C. (1965). Effects of fat content on diffusion of water in fish muscle. *J Sci Food Agric.* 16: 281-288.
- Jones, N. R. (1954). Taurine in fresh and iced skeletal muscle of codling (*Gadus callaris*). *Biochem J.* 56 (4): xxii.
- Jorhem, L. (2000). Determination of metals in food by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL Colabrative study. *J. Assoc Off Anal Chem Inter.* 83(5):1204-1211.
- Karovicová, J., Kohajdová, Z. (2005). Biogenic Amines in Food Review. *Chem Papers.* 59 (1): pp. 70-79.
- Kinsella, J. E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. In: Fox, P. F.; Condon, J. J.(eds), Food Proteins. *J Aplied Sci Publish.*pp 63-75.
- Kirsten, W., Hesselius, G. (1983). Rapid, automatic, high capacity. Dumas determination of nitrogen. *Microchem J.* 28: 529-547.
-

-
- Klaveren, F. W., Legendre, R. (1965). Salted Cod. In: Fish as Food. In G. Borgstrom (Ed.). Processing - Parte 1, (Vol. III). New York: Academic Press. pp.133-160
- Kurlansky, M. (2000). *O bacalhau, biografia do peixe que mudou o mundo*. (J. M. Pinheiro, Trad.) Terramar. 291 p
- Lambert, B., Joos, H., Dierickx, S., Vantomme, R., Swings, J., Kersters, K., et al. (1990). Identification and Plant Interaction of a *Phyllobacterium* sp., a Predominant Rhizobacterium of Young Sugar Beet Plants. *Appl Environ Microbiol.* 56(4): 1093-1102.
- Lauritzen, K. (2004). *Quality of salted cod (Gadus morhua L.) as influenced by raw material and salt composition*. University of Tromsø: Norwegian College of Fishery Science. 48 p.
- Lauritzen, K., e Olsen, R. L. (2004). Effects of antioxidants on copper induced lipid oxidation during salting of cod (*Gadus morhua* L.). *J Food Lipids.* 11: 105-122.
- Lear. (1984). Atlantic Cod. *Underwater World. Communications Directorate. Department of Fisheries and Oceans*. Ottawa, Ontário, Canada.
- Lee JC, J. C. (2005). Halomonas taeanensis sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syste Evol Microbiol.* 55(Pt 5): 2027-2032.
- Legendre, R. V. (1955). The artificial drying of lightly salted codfish. *J Fish Res Board Can.* XII, Nº1: 68- 74.
- Lehane, L., Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. Review. *Int J Food Microbiol.* 58: 1-37.
- Li, W.-J., Chen, H.-H., Kim, C.-J., Park, D.-J., Tang, S.-K., Lee, J.-C., et al. (2005). *Microbacterium halotolerans* sp. nov., isolated from a saline soil in the west of China. *Inter J System Evol Microbiol.* 55: 67-70.
- López-Caballero, M., Sánchez-Fernández, J., Moral, A. (2001). Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained under different CO₂ and O₂ concentrations. *Inter J Food Microbiol.* 64: 277-287.
- López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J., Hernández-Herrero, M., M. T.-S. (1996). Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *Inter J Food Microbiol.* 28: 411-418.
- Manso, F. ; Cruz, Ó. (1984). *A Epopeia dos Bacalhaus* (203 ed.). Porto: Edições ASA.
- Marino M., M. M. (2000). The capacity of enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Appl Microbiol.* 31: 169-173.
-

-
- Marques, F. C. (2001). A pesca do bacalhau. (H. Viana, J. Amaral, e M. J. Camacho, Edits.) *Oceanos. Terra Nova A epopeia do bacalhau*. 45 (Janeiro/Março): 136-152.
- Massol-Deya, Odelson DA, H. R., JM, T. (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S-23S ribosomal gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In A. ADL, Van-Elsas, JD, & de-Bruijn (Edits.), *Molecular Microbial Ecol Methods*. Kluwer Academic Publishing. Boston. pp. 1-8
- Matos, L. J. (de 2001). O Atlântico Noroeste e a Terra Nova (Terra dos Corte Reais). (H. Viana, J. Amaral, M. J. Camacho, Edits.) *Oceanos. Terra Nova - A epopeia do bacalhau*. 45 (Janeiro/Março): 8-20.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques* (3 ed.). Boca Raton: CRC Press. pp. 250-284
- Mejlholm, O., Boknaes, N., Dalgaard, P. (2005). Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *J Appl Microbiol*. 99(1): 66-76.
- Monraia, C. (1997). Caracterização da flora microbiológica do bacalhau salgado seco. *Rev Port Nutrição*, VII, Nº3: 45-52.
- Moutinho, M. (1985). *História da Pesca do Bacalhau, por uma antropologia do "Fiel Amigo"*. Editorial Estampa. Lisboa.
- Murray, J., Burt, J. (1969). The composition of fish. (T. R. Aberdden, Ed.) *Torry Advis, Note 38*.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nubel, U., Santegoeds, C., Schaver, H. (1998). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial Ecology. In A. ADL, Van-Elsas, JD, & d.-B. FJ (Edits.), *Molecular Microbial Ecology Methods*. Kluwer Academic Publishing. Boston. pp. 1-27.
- Muyzer, G., Hottentrager, S., A.Teske, C.Wawer. (1996). Denaturing gradient gel eletrophoresis of PCR-amplified 16SrDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In A. ADL, van-Elsas, JD, & d.-B. FJ (Edits.), *Molecular Microbial Ecology Methods*. Kluwer Academic Publishing. Boston. pp. 1-23
- Nettleton, N. A. (1985). *Seafood Nutrition: Facts, Issues and Marketing of Nutrition in fish and shellfish*, (1 ed.): Osprey Books. Huntington, NY, USA. 280 p.
- Nguyen, M. V., Arason, S., Thorarinsdottir, K. A., e Thorkelsson, G. (2010). Influence of salt concentration on the salting kinetics of cod loin (*Gadus morhua*) during brine salting. *J Food Engin* 100: 225-231.
- Nguyen, V. M. (2007). *The effects of storing and drying on the quality of cured, salted cod*. Reykjavik, UNU - Fisheries Training Programe. Iceland.58 p
-

-
- Niven, C., Jeffrey, M., Corlett, D. A. (1981). Differential planting medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl Envir Microbiol*: Vol 41, N° 1(Janeiro): 321-322.
- Okeke, B., Giblin, T., Frankenberger Jr. W.T. (2002). Reduction of perchlorate and nitrate by salt tolerant bacteria. *Environ Pollut*. 118(3): 357-363.
- Olafsdottir, G., Lauzon, H., Martindóttir, E., Oehlenschager, J., Kristbergsson, K. (2006). Evaluation of Shelf Life of Superchilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets and the Influence of Temperature Fluctuations During Storage on Microbial and Chemical Quality Indicators. *J Food Sci*. 71 N°2: 97-109.
- Patil, G., Madhusudhan, M. C., Ravindra Babu, B., & Raghavarao, K. S. (2009). Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemi Engine. Proces.: Process Intensificatio*, 48 (1):364-369.
- Pedro, S., Magalhães, N., Albuquerque, M., Batista, I., Nunes, L., Bernardo, F. (2002). Preliminary Observations on Spoilage Potential of Flora from Desalted Cod (*Gadus morhua*). *J Aquatic Food Product Technol*. Vol. 11 (3/4):143-150.
- Penso, G. (1953). Valeur Alimentaire, inspection sanitaire, réfrigération et congélation, conserves et sous-produits, outillage industriel. (Vigot Frères, Ed.) *Les Produits de La Pêche*, 19, 37 XXIV. Paris. 418 p.
- Pochon, J., Tardieux, P. (1962). Techniques d'analyse em Microbiologie du sol. In *Collection Technique de Base*. M.R. Dujarric de la Riviere. pp. 56-105.
- Pokorny, J. (1981). Browning from Lipid-protein interactions. *Prog Fd Nutritional Sci*. 5: 421-428.
- Puskas, A. (1997). A Quorum-Sensing System in the Free-Living Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*. 179(23) Dezembro: 7530-7537.
- Regulamento (CE) N°1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007.que altera o regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Journal Oficial da União Europeia, L322/12-29.
- Reps, A. (1999). Bacterial surface-ripened cheeses. In: P. F. Fox, (Ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology (Major cheese groups)*. Vol. II. (2ª ed.) Aspen Publication... London. pp. 135-170
- Rivas, B. d., Marcobal, Á., 1Munõz, R. (2005). Improved multiplex-PCR method for th simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol Letters* 244: 367-372.
- Rodrigues, M. F. (2001). O regresso `Terra Nova dos bacalhaus de navios armados em Aveiro e Ílhavo. (H. Viana, J. Amaral, & M. J. Camacho, Edits.) *Oceanos - Terra Nova. A epopeia do bacalhau*, 45 (Janeiro/Março): 76-88.
- Rodrigues, M. J. (2006). *Estudos de qualidade em bacalhau. Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas*. Universidade do Porto - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. Porto. 205 p
-

-
- Rodrigues, M. J., López-Caballero, H. P., Vaz-Pires, M., Nunes, M. (2003). Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food microbiol.* 20: 471-481.
- Romanenko, L. A., Schumann, P., Zhukova, N. V., Rohde, M., Mikhailov, V. V., & Stackebrandt, E. (2003). *Oceanisphaera litoralis* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium from marine bottom sediments. *Inter. J. of System Evol Microbiol.* 53: 1885-1888.
- Sainclivier, M. (1985). Des Techniques ancestrales a leurs realizations contemporaines: Salage, S'chage, Fumage, Marnage, Hidrolysats. *L'Industrie Alimentaire Halieute. 12° Vol. Sciences Agronomiques.* Rennes. França.434 p.
- Salgado, A. A. (2001). O confronto pelo domínio do Atlântico Norte. *Ocenos. Terra Nova. A epopeia do bacalhau.* 45 (Janeiro/Março): 48-60.
- Sampaio, A. (1923). As povoaas marítimas. *Estudos históricos e económicos.* 1: p. 294 e seg.
- Santos, M. H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Inter J Food Microbiol.* 39: 227-230.
- Shewan, J. M. (1961). The microbiology of sea-water fish. In: Borgstrom, G. (Ed.). *Fish as food: production, biochemistry and microbiology*(Vol. I). Academic Press. New York pp. 487-560.
- Silva, M. V., Pinho, O., Ferreira, I., Plestilová, L., & Gibbs, P. A. (2002). Production of histamine and tyramine by bacteria isolated from Portuguese vacuum-packed cold-smoked fish. *Food Contro.* 13: 457-461.
- Skjerdal, O. T., Lorentzen, G., Tryland, I., Berg, J. D. (2004). New method for rapid and sensitive quantification of sulphide-producing bacteria in fish from artic and temperate waters. *Inter J Food Microbiol.* 93: 325-333.
- Skjerdal, O., Lorentzen, G., e Joensen, S. A. (1997). Microflora in desalted cod. *27 th WEFTA – Meeting.* Madrid Spain.
- Soudan, F. (1955). Aspects chimiques du salage de la Morue. *Revue Travaux de L'institut de Pêches Maritimes.* pp. 129-306.
- Suresh, K., Mayilraj, S., Bhattacharya, A., Chakrabarti, T. (2007). *Planococcus columbae* sp. nov., isolated from pigeon faeces. *Inter. J. Systemc Evol Microbiol.* 57(Pt 6): 1266-1271.
- Tarr, h. (1939). The Bacterial reduction of Trimethylamine Oxide to Trimethylamine. *J Fish Res Board Can.* 4(5): 367-377.
- Tarr, H. (1955). Fish muscle riboside hydrolses. *Biochem J.* 59: 386-391.
- Thorarinsdottir, K. A. (2010). The influence of salting procedures on the characteristics of heavy salted cod. 102. Lund University, Department of Food Technology, Sweden. 103 p
-

-
- Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Bogasn, S. G., Kristbergsson, K. (2004). The effects of various salt concentrations during brine curing of cod (*Gadus morhua*). *Inter J Food Sci Technol.* 39, p. 79.
- Tiecco, G., Tantillo, G., Francioso, E., Paparella, A., DeNatale, G. (1986). Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in insaccati nel corso della stagionatura. *Ind Aliment.* 5: 209-213.
- Tressler, D. K., Lemon, J. M. (1951). *Marine Products of commerce*. Reinhold. New York 782 p.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada, K. (1999). Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology.* 145 (Pt 11): 3305-3315.
- Varela, C. (2001). O controlo das rotas do bacalhau nos séculos XV e XVI. (H. Viana, J. Amaral, & M. J. Camacho, Edits.) *Oceanos. Terra Nova, A epopeia do bacalhau.* 45 (Janeiro/Março): 22-30.
- Veciana-Nogués, M., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. (1997). Biogenic Amines as Hygienic Quality Indicators of Tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds. Volatile Amines and Organoleptic Changes. *J Agric Food Chem.* 45: 2036-2041.
- Vilhelmsson, Hafsteinsson, H., Kristjánsson, J. (1996). Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from fully cured salted cod (bachalao). *J App Bacteriol.* 81: 95-103.
- Vilhelmsson, O., Hafsteinsson, H., Kristjánsson, J. (1997). Extremely halotolerant bacteria characteristic of fully cured and dried cod. *Inter J Food Microbiol.* 36: 163-170.
- Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M., Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H₂S-Producing Species during Iced Storage of danish Marine Fish. *App Environ Microbiol.* 71: 6689-6697.
- Wheaton, F. W., e Lawson, T. B. (1985). *Processing aquatic food products*. Nova Iorque EUA. 536 p
- Wood, E. J. (1940). *Coun. Sci. Ind Res Australia Pamph.* 100: 1-92.
- Yoon, J., Kang, S., Oh, K., Oh, T. (2009). *Salimicrobium flavidum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Inter J System Evol Microbiol.* 59(Pt 11): 2839-2842.
- Yumoto, I., Hishinuma-Narisawa, M., Hirota, K., Shingyo, T., Takebe, F., Nodasaka, Y., et al. (2004). *Exiguobacterium oxidotolerans* sp. nov., a novel alkaliphile exhibiting high catalase activity. *Inter J System Evol Microbiol.* 54 (n° 6): 2013-2017.
- Zaleski, S., Jara, S., Sobolewska-Ceronik, K. (1970). Quantitative and Qualitative changes of microflora in a skin slime of cod-fish stored in a sterile ice. *Acta Ichthyologica et piscatoria.* 1: 127-135.
-

CIBERGRAFIA

Agência Financeira:

<http://www.agenciafinanceira.iol.pt> [acedido em 3 de Setembro de 2012]

Continente: continenteonline [acedido em 3 de Setembro de 2012]

Corte Inglês: catalogos.elcorteingles.pt [acedido em 3 de Setembro de 2012].

Gaspe cure. (s.d.),

<http://www.gaspecured.com/english> [acedido em 2 de Maio de 2012]

Genbank:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> [acedido em 25 Novembro de 2011 e Setembro de 2012]

Greenpeace (2010):

[http://www.greenpeace.org/portugal/pt/O-que-fazemos/Campanha-Dos-Oceanos Mercados-em-Portugal/Sera-que-ainda-podemos-comer-bacalhau/](http://www.greenpeace.org/portugal/pt/O-que-fazemos/Campanha-Dos-Oceanos-Mercados-em-Portugal/Sera-que-ainda-podemos-comer-bacalhau/) [acedido em Setembro de 2012]

Higgins, J. (2007). 19th Century cod fisheries. Newfoundland and Labrador Heritage: http://www.heritage.nf.ca/society/19th_cod.html [acedido em 3 Maio de 2009]

Hiller, J. K. (1998). "The Newfoundland Interior "The Beothuk Phase"". heritage.nf.ca. http://www.heritage.nf.ca/exploration/nf_interior.html. [acedido em 3 Maio de 2009]

Toltec International, I. (2006). *How Hemodialysis (Dialysis) Works*. http://www.toltec.biz/how_hemodialysis_works.html [acedido em 2 de Outubro de 2009]

<http://www.scientificlib.com/en/Biology/Animalia/Chordata/Vertebrata/GadusMorhua01.html> [acedido em 3 Maio de 2012]

WIKIPEDIA.ORG/WIKI/FILE:GADUS_MORHUA-ATLANTIC_COD.PNG: (Distribuição do bacalhau no Atlântico Norte). [acedido em 2 de Outubro de 2009]

ANEXO I

A - ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

a) Preparação de Triptona Sal:

Triptona (SHARLAU 07-154) – 1 g/L

NaCl Riedel-de Haën 31434– 10 g/L

Esterilização do meio: a 121 °C durante 15 min

b) Determinação de Mesófilos Aeróbios Totais:

Extracto de levedura (SHARLAU 07-079) - 2,5 g/L

Triptona (SHARLAU 07-154) - 5 g/L

Glucose (SHARLAU GL 01291000) - 1 g/L

(com 0% e 1% de NaCl)

Distribuição de 10 mL por tubo.

Esterilização do meio: a 121 °C durante 15 min

Incubação: 28 °C, 4 dias

Leitura: considerados positivos os tubos que apresentam turvação do meio

c) Determinação de Bactérias Lácticas:

Meio commercial MRS Broth (Man Rogosa Sharpe OXOID CM0359):

Distribuição de 10 mL por tubo. Acertar o pH 6.

Esterilização do meio: a 121 °C durante 15 min

Incubação : 28 °C, 4 dias

Adição de 3 gotas de óleo de parafina depois da inoculação do meio.

Leitura: considerados positivos os tubos que apresentam turvação do meio

d) Determinação Bactérias Sulfitorredutores:

Adaptou-se a fórmula do meio comercial Agar Ferro de Lingby (Iron Agar de Lingby OXOID CM0964), retirando o Agar:

Bacto peptona (SHARLAU 07-154) - 20 g/L

Lab-Lemco (Himedia RM002) - 3g/L

Extracto levedura (SHARLAU 07-079) - 3g/L

Citrato Férrico – (Riedel-de Haën 25119)0,3 g/L

Tiosulfato de Sódio - 0,3 g /L

NaCl - 5g/L

Distribuição de 10 mL por tubo.

Adição de L- Cisteína (MERCK K 24333539) previamente esterilizada por filtração.

Esterilização do meio: a 121 °C durante 15 min

Incubação: 28 °C, 4 dias

Leitura: considerados positivos os tubos que apresentam escurecimento do meio

Controlo positivo: *Shewanella putrefaciens* (estirpe cedida pelo IPIMAR)

e) Determinação Bactérias Proteolíticas:

Metodologia indicada por Pochon *et* Tardieux (1962):

Solução salina* - 50 mL

Gelatina (Gelatina Bacteriológica Liofilchem 611002)- 30 g

Solução de Oligo- elementos** -1mL

Água Destilada- 1000 mL

Acertar o pH 7,2

Distribuir 2 mL/tubo + 0,5 das diluições /amostra

Esterilização do meio: a 110 °C durante 20 min

Leitura: ao fim de 15 dias. Arrefecer os tubos 2°- 4°C durante 1:30 h

Tubos que apresentem o meio liquefeito são considerados com resultado (+)

f) Determinação Bactérias Amonificantes:

Metodologia indicada por Pochon *et* Tardieux (1962):

Solução salina* - 50 mL

L- Asparagina (SCHARLAU AS0015)-0,2 g

Solução de oligo-elementos*** -1 mL

Água destilada - 950 mL

Distribuir 10 mL /tubo

Esterilização do meio: a 110 °C, 20 min

Incubação: 28 °C, até 15 dias

Leitura: ao fim de 1, 2,3,4,5,7,9,12 e 15 dias

Retirar 1 mL para outro tubo (de Kahn) e adicionar 2 gotas de reagente de Nessler (Panreac 171581.1209)

Se o meio apresentar cor alaranjada, considera-se (+).

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES**Solução salina***

PO₄HK₂ (MERCK 4873)-----5 g/L
SO₄Mg (MERCK 5886)-----2,5 g/L
NaCl (Riedel-de Haën 31434)-----2,5 g/L
(SO₄)₃Fe₂ (Riedel-de Haën 31148)-----0,05 g/L
SO₄Mn (MERCK F463741812)-----0,05 g/L

Solução de oligo-elementos**

Molibdato de potássio (Aldrich 236-599-2)---0,05 g/L
Borato de Sódio (Panreac 131644-1210)-----0,05 g/L
Perclorato de ferro (Aldrich 334081) -----1 gota/L
Nitrato de cobalto Co(NO₃)₂ (MERCK 2536)-----0,05 g/L
Sulfato de cádmio CdSO₄ (Riedel-de Haën 31148)-----0,05 g/L
Sulfato de zinco Zn₂(SO₄)₃-(sem marca comercial)-----0,05 g/L
Sulfato de manganésio MnSO₄ (MERCK 5963) ----0,05 g/L
Sulfato de cobre (sem marca comercial)-----0,05 g/L
Acertar o pH 7 -7,5

Esterilização das soluções: a 110 °C durante 15 min

g) Determinação Bactérias produtoras de histamina:

Meio desenvolvido por Niven *et al.* (1981):

Bromocresol (Riedel 32642)- 0,006 g/L
Amino-ácido Histidina(SCHARLAU H10395) - 27 g/L
Tryptona (SHARLAU 07-154) - 5 g/L
Extracto de Levedura (SHARLAU 07-079) -5 g/L
NaCl Riedel-de Haën (31434) -5 g/L
CaCO₃ – (Riedel –de Haen 31208)1 g/L
Acertar: pH 5,3

Distribui-se 2 mL de meio por tubo de ensaio.

Para a composição de meio sólido adicionar 2% de agar.

Esterilização do meio: a 121 °C durante 10 min.

Incubação: a 28 °C durante 4 dias.

Leitura: são considerados positivos os tubos onde o meio que passa de laranja acastanhado para violeta, após incubação.

h) Determinação Bactérias Produtoras de Trimetilamina:

Utilização de Meio GMB (Growth Medium Broth com trimetilamina)

NaCl (Riedel-de Haën)31434 -2,5 g/L

Extracto de Carne (Himedia RM002) -10 g/L

Peptona (SHARLAU 07-154)-10 g/L

Extracto Levedura (SHARLAU 07-079) -3 g/L

Oxitrimetilamina (SIGMA t0514) -3,97 g/L

KCl (MERCK 104936)-0,75 g/L

FeSO₄. 7H₂O (MERCK 3965) - 0,014 g/L

H₂KPO₄ (MERCK 4873) -1,52 g/L

HK₂PO₄ (MERCK 5099) - 1,53 g/L

MgSO₄.7H₂O (MERCK 5886) - 0,75 g/L

Esterilização do meio: a 121 °C durante 10 min.

Incubação: a 28 °C durante 4 dias

Leitura: são considerados positivos os tubos onde o meio após incubação apresenta turvação (+) e aroma característico a trimetilamina.

i) Determinação Bactérias descarboxiladoras de aminoácidos:

Utilização de meio Descarboxylase Base Moeller (Decarboxylase Broth Base – Himedia M393).

Adição de 1% de aminoácidos: L-Arginina (Fisher Scientific BP 372-100); L-Ornitina (Fisher Scientific BP 389-100); L-Lisina (Fisher Scientific BP 386-100). Acertar pH a 6.

Esterilização do meio: a 121 °C durante 10 min.

Incubação: a 37 °C durante 72 h

Leitura: são considerados positivos os tubos onde o meio após incubação apresenta mudança de cor de laranja para violeta

j) Escala de McFarland:

Utilizou-se como padrão de comparação o 5 de McFarland (BioMérieux Ref 70900), constituído por $2,40 \times 10^{-4}$ mol/L de BaSO₄ que corresponde a 1500×10^6 bactérias/mL.

Preparam-se suspensões de células com uma turbidimetria de 5 McFarland.

Para comparação utilizou-se um espectrofotómetro Spectronic 70, Bausch&La

k) Tabelas de McCrady – determinação do número mais provável

Tabela 1: valores do NMP para 2 repetições de diluições sucessivas de razão 1:10
[Dados extraídos e adaptados na forma de Pochon e Tardieux, (1962); Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA, Washington (1971)]

| NC | | | NMP | NC | | | NMP |
|----------|----------|----------|------|----------|----------|----------|-------|
| <i>a</i> | <i>b</i> | <i>c</i> | | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>c</i> | |
| 0 | 0 | 0 | 0,00 | 2 | 1 | 0 | 6,20 |
| 0 | 0 | 1 | 0,45 | 2 | 1 | 1 | 13,00 |
| 0 | 1 | 0 | 0,46 | 2 | 1 | 2 | 21,00 |
| 1 | 0 | 0 | 0,60 | 2 | 2 | 0 | 24,00 |
| 1 | 0 | 1 | 1,20 | 2 | 2 | 1 | 70,00 |
| 1 | 1 | 0 | 1,30 | | | | |
| 1 | 1 | 1 | 2,00 | 2 | 2 | 2 | > 100 |
| 1 | 2 | 0 | 2,10 | | | | |
| 2 | 0 | 0 | 2,30 | | | | |
| 2 | 0 | 1 | 5,00 | | | | |

NC Número de tubos positivos observados nas diluições escolhidas *a*, *b* e *c*

NMP Número mais provável de organismos por mL na diluição *a*

Limites fiduciários aproximados, ao nível de 95%

l) Preparação da mistura para PCR para realização do PCR fingerprinting:

Juntou-se 1 µl da suspensão de células lisadas com 2,5 µl de 10X buffer [60 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM TrisHCl pH 8.8, 0,1% Tween 20] 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 2,5 µl 0,1% BSA, 0,5 µl 10 µM dNTPs, 0,5 µl 50 pmol/ µl Primer Csm13, 0,2 µl of 5U/ µl Taq DNA polymerase (W-1, Invitrogen). A misturas para PCR assim obtidas, foram ajustadas com 16,3 µl de água Milli-Q esterilizada perfazendo um volume final de 25 µl.

m) Preparação da mistura para PCR, para posterior purificação e sequenciação:

Juntou-se 1 µl de DNA com 5 µl de 10X [60 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM TrisHCl pH 8.8, 0,1% Tween 20] 2 µl of 50 mM MgCl₂, 1 µl of 10 µM dNTPs, 1 µl 50 pmol/ µl Primer PA, 1 µl 50pmoles/ µl Primer 1392R (ou 907R) e 0,2 µl 5U/ µl Taq DNA polymerase (with W-1, Invitrogen). As misturas para PCR, assim obtidas, foram ajustadas com 38,8µl de água Milli-Q esterilizada perfazendo um volume final de 50 µl.

A - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

a) Determinação do Teor de Cloretos em Bacalhau e Espécies Afins Salgadas, Verdes, Semi-secas ou Secas:

De acordo com Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de Janeiro.

Entende-se por teor de cloretos a quantidade total de iões de cloro expressa em percentagem em massa de cloreto de sódio.

Solubilização dos cloretos, precipitação por excesso de nitrato de prata e titulação desse excesso com tiocianato de amónio em presença do alúmen férrico.

b) Determinação do Teor de Azoto de Trimetilamina (N-TMA):

De acordo com NP 1841-1, 2009. Determinação do teor de azoto de trimetilamina (N-TMA).

Entende-se por azoto de trimetilamina o azoto das bases voláteis que não reage com aldeído fórmico, determinado nas condições a seguir descritas.

Extracção dos produtos azotados do pescado por meio de uma solução de ácido tricloroacético e fixação pelo aldeído fórmico das aminas primárias e secundárias. Alcalinização por acção de carbonato de potássio para libertação da trimetilamina e sua recepção numa solução de ácido bórico seguida de titulação.

Pesaram-se 50 g + 100 mL (25 g de massa+50 mL TCA 5% com dispensador).

Homogeneizou-se (se ficar muito turvo centrifugar a 2000-3000 rpm) e filtrou-se com filtro para frasco de Erlenmeyer

Com pipeta de precisão pipetou-se 1 mL de ácido bórico para o centro da célula de Cornway, adicionando 0,5 mL de água destilada para coroa circular, bem como 2 mL do filtrado. Adicionou-se 16 gotas de formaldeído e 1ml de solução de carbonato de potássio. Fechou-se rapidamente, e rodou-se para misturar soluções

Colocou-se na estufa a 90 min 40 °C (ou 2h a 35 °C). Titulou-se com a solução de HCl até coloração rosa (0,02 N)

Fez-se controlo de difusão (usando em vez da amostra sulfato de amónio).

Fez-se branco (substituindo amostra por água)

c) Determinação do Teor de Azoto Básico Volátil Total (N-ABVT):

De acordo com NP 2930,2009. Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT).

Pesaram-se 50 g + 100mL (25 g de massa+50 mL TCA 5% com dispensador).

Homogeneizou-se (se ficar muito turvo centrifugar a 2000-3000 rpm) e filtrou-se com filtro para frasco de Erlenmeyer

Com pipeta de precisão pipetou-se 1 mL de ácido bórico para o centro da célula de Cornway, adicionando 0,5 mL de água destilada para coroa circular, bem como 1 mL do filtrado. Adicionou-se 1mL de solução de carbonato de potássio. Fechou-se rapidamente, e rodou-se para misturar soluções

Colocou-se na estufa a 90 min 40 °C (ou 2 h a 35 °C). Titularam-se as bases voláteis libertadas e recolhidas no ácido bórico com a solução de HCl até coloração rosa (0,02 N)

Fez-se controlo de difusão (usando em vez da amostra sulfato de amónio).

Fez-se branco (substituindo amostra por água).

d) Determinação do Teor de Cinza Total:

De acordo com NP 2032, 2009. Determinação do teor de cinza total.

Pesaram-se 5 g de amostra para um cadinho que se colocou na mufla. Subiu-se gradualmente a temperatura durante 4 h, até atingir 500 °C e deixou-se na mufla por cerca de mais 14 h. Retirou-se para exsiccador onde permaneceu até arrefecer para proceder à pesagem. Voltou-se a colocar o cadinho na mufla por mais 30 min após os quais se retirou e pesou novamente. Repetiu-se o procedimento até peso constante.

e) Determinação do Teor de Matéria Gorda Livre:

De acordo com NP 1972, 2009. Determinação do teor de matéria gorda livre.

Adicionou-se uma colher de sulfato de sódio anidro a 10 g de amostra. Homogeneizou-se com pilão e colocou-se a mistura em cartuchos de papel apropriado. Colocou-se o cartucho no extractor. A extracção foi efectuada com éter etílico durante 7 h a 350 °C.

f) Determinação de Histamina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC):

De acordo com NP 4490, 2009. Determinação do teor de histamina.

Pesaram-se 25 g de cada amostra, que foram completamente triturados e misturados com 50 mL de ácido tricloroacético (TCA - 10%). Homogeneizou-se muito bem em Ultra turrax. Após a homogeneização filtrou-se usando papel de filtro (netmer nº2 MN 616 com diâmetro 150 mm). Esta primeira filtração foi seguida de uma segunda usando filtros 0,2 µm PTFE membrane (PN 4225 T 50/PK) PALL Life Sciences. A partir do filtrado, assim obtido, retirou-se 1 mL que se misturou com 50 µl de padrão interno Injectar no HPLC (injector, fluorímetro, programador) Esta mistura foi injectada no aparelho HPLC.

g) Determinação do Teor de Humidade:

De acordo com NP 2282, 2009. Determinação da humidade.

A definição e o resumo do processo são os constantes da NP 2282 de 1991 exceptuando a dispersão da amostra em areia.

Colocar caixas na estufa a 105 °C durante 30' e depois exsiccador até arrefecer 10 g de amostra picada para cristizador de vidro

Secar em estufa a 105 °C durante uma noite Retirar de manhã o cristizador

Colocar num exsiccador e deixar arrefecer, pelo menos 30 min e pesar

h) Determinação do teor de azoto e aminoácidos livres – método Titrimétrico – INRB-IP L-IPIMAR:

Preparou-se uma mistura homogeneizada de 25 g de amostra com solução de ácido tricloroacético 20%, utilizando Ultra turrax. Deixou-se repousar durante 10 min cronometrados. Filtrou-se usando papel de filtro (netmer nº2 MN 616 com diâmetro 150 mm), e procedeu-se a neutralização do extracto com NaOH 15%, em presença de indicador (fenolftaleína – 2 a 3 gotas) e adição de formaldeído 37%.

Titular o excesso de acidez com NaOH a 0,1 N.

i) Determinação da Proteína:

A quantidade de proteína foi determinada de acordo com o método de Dumas (Kristen e Hesselius, 1983) e com o procedimento técnico em uso na U-VPPA do IPMA, I.P. num aparelho de análise de azoto.

O método consiste na combustão da amostra na presença de O₂ num tubo de combustão e, conseqüentemente libertação de CO₂, H₂O e N₂. Enquanto o CO₂ e H₂O são removidos por absorção em colunas, o teor de azoto é medido por uma célula de condutividade térmica para o azoto.

Este método de combustão foi assim efectuado com recurso ao aparelho LECO, FP-528: TC Cell output 4000 v, TC Cell Current 89,7 ma, System Pressure 749 mm, 850°C).

j) Determinação de K, Mg e Na:

Seguiu-se a metodologia proposta por Jorhem (2000): Pesaram-se 5 g de cada uma das amostras analisadas depois de trituração e homogeneização, para cadinhos de quartzo. Estes foram sujeitos a secagem em estufa a ± 100 °C durante uma noite. Após esta secagem colocaram-se na mufla, elevando a temperatura muito lentamente até atingir os 500 °C, temperatura que se manteve durante 26 h para calcinar. Depois deste período de tempo, as amostras foram retiradas e arrefecidas à temperatura ambiente. Humedeceram-se as cinzas com ácido nítrico 65%, que foi evaporado cuidadosamente sobre uma placa eléctrica, até secar completamente. Colocaram-se novamente os cadinhos na mufla a ± 400 °C, durante 30 min até as cinzas ficarem brancas. Para dissolver as cinzas adicionaram-se posteriormente, 6 ml de ácido nítrico 15% quente e transferiu-se filtrando para balão de 25 mL. Os cadinhos foram lavados com 6 mL do mesmo ácido e posteriormente com água ultra pura. Passou-se pelo filtro ambas as soluções de lavagem. Deixou-se arrefecer e perpez-se o volume com água ultra pura, agitando-se de seguida.

O equipamento usado foi o espectrofotómetro de absorção atómica de chama Varian Spectra AA 55B com Software 220 Z. A chama utilizada foi de ar-acetileno para todos os metais e a introdução da amostra foi feita através de um amostrador automático (Varian, SPS3- Sample Preparation System).

Para determinação do potássio as condições foram: comprimento de onda 766,5 nm, Intensidade 5 mA, abertura de fenda 1 nm, lâmpada de cátodo-oco; Para o magnésio foram: comprimento de onda 285,2 nm, Intensidade 4 mA e 0,5 nm de abertura; Para o sódio foram: comprimento de onda de 589,0 nm Intensidade de 5 mA, e 0,5 nm de abertura. A leitura de absorção para cada elemento foi efectuada no respectivo comprimento de onda e registou-se o sinal máximo da absorção obtido pelo aparelho.

Preparou-se soluções padrão (100 mL) de concentração 10 µg/mL a partir da solução padrão a 1000 mg/L, respectiva para cada elemento utilizando como solvente ácido nítrico a 5%. A partir desta solução padrão a 10 µg/mL, foram preparadas as soluções padrão utilizadas para traçar a curva de calibração de acordo com a Tabela 3.

Tabela 2 – Padrões correspondentes à curva de calibração para o potássio (K), magnésio (Mg) e sódio (Na)

| Elemento | Padrões (µg/ml) | | | | |
|----------|-----------------|------|------|------|------|
| K | 0,20 | 0,40 | 0,80 | 1,00 | 1,20 |
| Mg | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,30 | 0,40 |
| Na | 0,20 | 0,40 | 0,60 | 0,80 | 1,00 |

Obteve-se o teor de cada elemento por comparação com a recta de calibração, sendo os resultados expressos em mg/kg (ppm), dado pela relação:

$$\frac{\textit{leitura} (\mu\text{g/mL}) \times \textit{volume de dissolução da amostra} (\text{mL})}{\textit{massa da toma para análise} (\text{g})}$$

ANEXO II

Tabela 1 – Resultados relativos à caracterização das estirpes bacterianas isoladas (0) negativo; (1) positivo

| Código | forma/aglomeração celular | Gram | Teste Catalase | Teste Oxidase | Apresenta crescimento a | | | | | | | Fase Processo | Origem | Grupo Funcional | Diluição |
|--------|---------------------------|------|----------------|---------------|-------------------------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|------------------|--------|---------------------|----------|
| | | | | | 15 °C | 30 °C | 37 °C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | | | | |
| 1 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 2 | bacilos curtos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 3 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 4 | diplococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 5 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 6 | bacilos curtos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 8 | sarcinas | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 9 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 10 | estreptococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 11 | estafilococos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 12 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -2 |
| 13 | tetradas | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 14 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 15 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | L | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 16 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | L | Trimetilamina Prod. | -2 |
| 17 | estreptococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | L | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 20 | sarcinas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 22 | ND | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 23 | sarcinas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 24 | estafilococos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 25 | tetradas/diplococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 27 | sarcinas | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 28 | estreptococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 29 | sarcinas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 30 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Histamina Prod. | -2 |
| 32 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Histamina Prod. | -3 |
| 33 | cocos em cadeias curtas | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Secagem | R | Aeróbios Totais | -6 |
| 34 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Secagem | R | Aeróbios Totais | -7 |
| 35 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Aeróbios Totais | -7 |
| 36 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Demolha | R | Aeróbios Totais | -7 |
| 37 | estafilococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Aeróbios Totais | -4 |
| 38 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Aeróbios Totais | -4 |
| 39 | estreptococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Demolha | R | Aeróbios Totais | -4 |
| 40 | bastonetes | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Salgado verde | R | Aeróbios Totais | -4 |
| 41 | diplococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Aeróbios Totais | -3 |
| 42 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Demolha | R | Aeróbios Totais | -3 |
| 43 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | L | Aeróbios Totais | -3 |
| 44 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | Salgado verde | L | Aeróbios Totais | -3 |
| 45 | bastonetes | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Aeróbios Totais | -4 |
| 46 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Aeróbios Totais | -4 |
| 47 | diplococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Secagem | L | Aeróbios Totais | -4 |
| 48 | bacilos curtos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Secagem | L | Aeróbios Totais | -3 |
| 49 | baciloss | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Secagem | L | Aeróbios Totais | -4 |

| Código | forma/aglomeração celular | Teste Gram | Teste Catalase | Teste Oxidase | Apresenta crescimento a | | | | | | | Fase Processo | Origem | Grupo Funcional | Diluição |
|--------|---------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|-------------------------|--------|--|----------|
| | | | | | 15° C | 30° C | 37° C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | | | | |
| 50 | estreptococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Proteolíticos | -2 |
| 51 | bacilos curtos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Proteolíticos | -3 |
| 52 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Proteolíticos | -3 |
| 53 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | R | Proteolíticos | -2 |
| 54 | tetradas sarcina | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Secagem | R | Proteolíticos | -7 |
| 55 | sarcinas | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Proteolíticos | -4 |
| 56 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Proteolíticos | -4 |
| 57 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | R | Proteolíticos | -3 |
| 58 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Demolha | R | Proteolíticos | -3 |
| 59 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Secagem | R | Proteolíticos | -4 |
| 60 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Secagem | R | Proteolíticos | -4 |
| 63 | sarcinas | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Aeróbios Totais | -7 |
| 65 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Demolha | L | Proteolíticos | -3 |
| 66 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Secagem | R | Proteolíticos | -4 |
| 67 | sarcinas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Secagem | R | Proteolíticos | -6 |
| 68 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar* | -3 |
| 69 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar ¹⁰ | -3 |
| 70 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -3 |
| 71 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -2 |
| 72 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -3 |
| 73 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -4 |
| 74 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Demolha | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -4 |
| 75 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -3 |
| 77 | estafilococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Secagem | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -2 |
| 78 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Demolha | R | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -2 |
| 79 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | L | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -4 |
| 80 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -4 |
| 81 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Sulfitorreduzores em Iron Agar | -4 |
| 82 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | Primeira Secagem | L | Proteolíticos | |
| 1001 | cocos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 1003 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | L | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 1006 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | C | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 1007 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | C | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 1008 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pós secagem | C | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 1009 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Pós secagem | L | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 1011 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | C | Trimetilamina Prod. | -3 |
| 1014 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | C | Histamina Prod. | -4 |
| 1016 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Histamina Prod. | -2 |
| 1018 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Secagem final | L | Aeróbios Totais | -6 |
| 1020 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Proteolíticos | -6 |
| 1021 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura branca tradicional | C | Lacticos em meio MRS | -6 |
| 1022 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | C | Aeróbios Totais | -6 |

¹⁰ * Correspondem a colónias sem cor negra

| Código | forma/aglomeração celular | Teste Gram | Teste Catalase | Teste Oxidase | 15° C | 30° C | 37° C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | Fase Processo | Origem | Grupo Funcional | Diluição |
|--------|---------------------------|------------|----------------|---------------|-------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|-------------------------|--------|--------------------------------|----------|
| 1023 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Secagem final | C | Lacticos em meio MRS | -3 |
| 1025 | estreptococos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura branca tradicional | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1026 | cocos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Pós secagem | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1028 | bacilos | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Pós secagem | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1029 | bacilos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Pós secagem | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1030 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1031 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1032 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura branca tradicional | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1034 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 meses | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1035 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 meses | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 1036 | ND | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Secagem final | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -2 |
| 1041 | estafiloc | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Amonificantes | -2 |
| 1042 | estafiloc | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Amonificantes | -2 |
| 1043 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | L | Proteolíticos | -6 |
| 1044 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | C | Proteolíticos | -4 |
| 1045 | estafiloc | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Proteolíticos | -3 |
| 1048 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Pós secagem | L | Proteolíticos | -3 |
| 1049 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Proteolíticos | -6 |
| 1050 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 meses | L | Proteolíticos | -6 |
| 1051 | cocos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Pós secagem | L | Proteolíticos | -4 |
| 1053 | bacilos | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira Demolha | C | Proteolíticos | -6 |
| 1057 | tetradas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | C | Proteolíticos | -4 |
| 1059 | tetradas | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Salgado verde | C | Proteolíticos | -4 |
| 1066 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 meses | C | Histamina Prod. | -1 |
| 1067 | estafilococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura branca tradicional | C | Histamina Prod. | -4 |
| 1071 | bastonetes | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Histamina Prod. | -4 |
| 1072 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Histamina Prod. | -3 |
| 1074 | estreptococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Secagem final | L | Histamina Prod. | -3 |
| 1078 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Histamina Prod. | -3 |
| 1080 | sarcinas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura branca tradicional | L | Histamina Prod. | -2 |
| 1082 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Secagem final | C | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 1084 | diplococos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Secagem final | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1088 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 meses | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1092 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1094 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 meses | L | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 1096 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1098 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 semanas | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1100 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura branca tradicional | L | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 1106 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura branca tradicional | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1107 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura branca tradicional | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1061 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Proteolíticos | -3 |
| 1062 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Secagem final | L | Proteolíticos | -3 |
| 1097 | estafilococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1077 | cocos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 semanas | L | Histamina Prod. | -2 |

| Código | forma/aglomeração celular | Teste Gram | Teste Catalase | Teste Oxidase | 15° C | 30° C | 37° C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | Fase Processo | Origem | Grupo Funcional | Diluição |
|--------|---------------------------|------------|----------------|---------------|-------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|-------------------------|--------|--------------------------------|----------|
| 1091 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 meses | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1093 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1073 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 semanas | C | Histamina Prod. | -3 |
| 1103 | sarcinas | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Cura branca tradicional | L | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 1065 | estafilococos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 meses | C | Histamina Prod. | -2 |
| 1075 | bacilos curvos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Secagem final | L | Histamina Prod. | -3 |
| 1068 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 meses | L | Histamina Prod. | -3 |
| 1070 | bastonetes | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 semanas | C | Histamina Prod. | -4 |
| 1085 | tetradas | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Secagem final | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1099 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Cura amarela 3 semanas | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1089 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Cura amarela 3 meses | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 1108 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Secagem final | L | Amonificantes | -3 |
| 2000 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Salgado verde | L | Aeróbios Totais | -4 |
| 2001 | est | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira secagem | L | Aeróbios Totais | -5 |
| 2002 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira secagem | C | Aeróbios Totais | -5 |
| 2003 | est | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Segunda Secagem | L | Aeróbios Totais | -6 |
| 2004 | est | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Secagem | C | Aeróbios Totais | -6 |
| 2005 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Terceira Secagem | L | Aeróbios Totais | -5 |
| 2006 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Terceira Secagem | C | Aeróbios Totais | -6 |
| 2007 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira secagem | C | Amonificantes | -2 |
| 2008 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | Primeira secagem | L | Amonificantes | -2 |
| 2009 | bacilos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | Primeira secagem | C | Amonificantes | -2 |
| 2010 | estafilococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | L | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 2011 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira secagem | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 2012 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira secagem | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 2013 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Primeira secagem | L | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 2015 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Segunda Secagem | L | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 2016 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Secagem | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 2017 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Terceira Secagem | L | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 2018 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Terceira Secagem | C | Trimetilamina Prod. | -5 |
| 2019 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -2 |
| 2020 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 2021 | estafilococos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira secagem | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -2 |
| 2022 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Secagem | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -3 |
| 2023 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Terceira Secagem | C | Sulfitorredutores em Iron Agar | -2 |
| 2024 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Terceira Secagem | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -2 |
| 2025 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Terceira Secagem | L | Sulfitorredutores em Iron Agar | -2 |
| 2026 | bacilos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Salgado verde | L | Proteolíticos | -2 |
| 2027 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | L | Proteolíticos | -3 |
| 2028 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | Primeira secagem | C | Proteolíticos | -2 |
| 2029 | cocos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira secagem | C | Proteolíticos | -2 |
| 2030 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira secagem | L | Proteolíticos | -3 |
| 2031 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Secagem | C | Proteolíticos | -6 |

| Código | forma/aglomeração celular | Teste Gram | Teste Catalase | Teste Oxidase | 15° C | 30° C | 37° C | NaCl 0% | NaCl 1% | NaCl 10% | NaCl 15% | Fase Processo | Origem | Grupo Funcional | Diluição |
|--------|---------------------------|------------|----------------|---------------|-------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|---------------------|--------|-----------------------------------|----------|
| 2032 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Segunda Secagem | L | Proteolíticos | -5 |
| 2033 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Terceira Secagem | C | Proteolíticos | -6 |
| 2034 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | C | Proteolíticos | -2 |
| 2035 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | Salgado verde | L | Trimetilamina Prod. | -4 |
| 2036 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira secagem | C | Histamina Prod. | -3 |
| 2037 | bacilos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Primeira secagem | L | Histamina Prod. | -3 |
| 2038 | estafilococos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Primeira Demolha | L | Histamina Prod. | -2 |
| 2039 | ND | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Salgado verde | L | Arginina Prod. | -3 |
| 2040 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Salgado verde | C | Arginina Prod. | -2 |
| 2041 | estafilococos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Terceira Secagem | L | Arginina Prod. | -2 |
| 2042 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | início putrefacção | C | Trimetilamina Prod. | -7 |
| 2043 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | início putrefacção | L | Trimetilamina Prod. | -7 |
| 2044 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | início putrefacção | C | Aeróbios Totais | -6 |
| 2045 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | início putrefacção | L | Aeróbios Totais | -5 |
| 2046 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | início putrefacção | C | Arginina Prod. | -2 |
| 2047 | cocos | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | início putrefacção | C | Proteolíticos | -2 |
| 2048 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | início putrefacção | C | Proteolíticos | -2 |
| 2049 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | início putrefacção | C | Proteolíticos | -2 |
| 2050 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção | C | Aeróbios Totais | -5 |
| 2051 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção | C | Aeróbios Totais | -7 |
| 2052 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Putrefacção | C | Trimetilamina Prod. | -6 |
| 2053 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção | C | Proteolíticos | -2 |
| 2054 | cocos | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção | L | Proteolíticos | -3 |
| 2055 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção | L | Proteolíticos | -3 |
| 2062 | cocos | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção Superf. | C | Aeróbios Totais em Agar Nutritivo | |
| 2063 | | | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção Superf. | C | Aeróbios Totais em Agar Nutritivo | |
| 2064 | | | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Putrefacção Superf. | C | Aeróbios Totais em Agar Nutritivo | |

Legenda: (0) negativo; (1) positivo

ANEXO III

Tabela 1 - Resultados relativos à identificação de estirpes isoladas a partir das amostras de bacalhau analisadas, sequenciadas pela base de dados GenBank do NCBI; Homologia (N) – número de nucleótidos iguais entre sequências/número de nucleótidos totais da sequência da amostra

| Código | Sequências com maior homologia e número de acesso no GenBank | Homologia (N) | Homologia% |
|--------|--|---------------|------------|
| 44 | JN644483.1 Kokuria palustris | 1188 | 99 |
| | JN615461.1 Kokuria palustris | | 99 |
| | JN390957.1 Kokuria sp. | | 99 |
| 17 | AB680958.1 Psychroacter sp. | 1435 | 98 |
| | JN681203.1 Psychroacter sp. | | 98 |
| | HQ730672.1 Psychroacter sp. | | 98 |
| 67 | JN644483.1 Kokuria palustris | 946 | 99 |
| | JN615461.1 Kokuria palustris | | 99 |
| | JN390957.1 Kokuria sp. | | 99 |
| 72 | HM584254.1 Exiguobacterium oxidotolerans | 1349 | 99 |
| | JF327442.1 Exiguobacterium oxidotolerans | | 99 |
| | HQ848048.1 Exiguobacterium sp. | | 99 |
| 73 | JF710993.1 Psychrobacter celer | 1376 | 99 |
| | AJ969173.1 Psychrobacter sp. | | 99 |
| | JF711008.1 Psychrobacter celer | | 99 |
| 36 | JQ043006.1 Bacterium | | 99 |
| | JF706520.1 Staphylococcus sp. | 1421 | 99 |
| | JN230520.1 Staphylococcus equorum | | 99 |
| 74 | NR043141 Psychrobacter namhaensis | 1280 | 99 |
| | JF139712.1 Uncultured bacterium | | 99 |
| | FJ900917.1 Uncultured bacterium | | 99 |
| 54 | HM584295.1 Psychrobacter glacincola | 1273 | 99 |
| | GU574734.1 Psychrobacter sp | | 99 |
| | EF640972.1 Psychrobacter glacincola | | 99 |
| 1100 | JQ043113.1 Bacterium | | 100 |
| | JQ043043.1 Bacterium | | 100 |
| | JN230520.1 Staphylococcus equorum | 1345 | 100 |
| 1088 | JN828951.1 Alcaligenes faecalis | 939 | 97 |
| | JF710960.1 Alcaligenes faecalis | | 97 |
| | JF710956.1 Alcaligenes faecalis | | 97 |
| 1045 | HQ238887.1 Kokuria rhizophila | 1310 | 99 |
| | JF225020.1 Uncultured bacterium | | 99 |
| | AP009152.1 Kokuria rhizophila | | 99 |
| 1006 | JN828951.1 Alcaligenes faecalis | 1356 | 100 |
| | JF710960.1 Alcaligenes faecalis | | 100 |
| | JF710956.1 Alcaligenes faecalis | | 100 |
| 1011 | EU862080.2 Pseudomonas fluorescens | 1055 | 99 |
| | JF327456.1 Pseudomonas sp. | | 99 |
| | JF327452.1 Pseudomonas fluorescens | | 99 |
| 1085 | JQ043034.1 Bacterium | | 99 |
| | AB680958.1 Psychrobacter | 1236 | 99 |
| | JN681217.1 Psychrobacter sp. | | 99 |
| 2026 | HM755672.1 Microbacterium oxydans | 1380 | 99 |
| | JF327481.1 Microbacterium oxydans | | 99 |
| | JN853773.1 Microbacterium oxydans | | 99 |
| 2019 | HM566011.1 Oceanisphaera sp. | 1373 | 99 |
| | HM489989.1 Oceanisphaera sp. | | 98 |
| | HQ340607.1 Oceanisphaera sp. | | 97 |

| Código | Sequências com maior homologia e número de acesso no GenBank | Homologia (N) | Homologia% |
|--------|--|---------------|------------|
| 2036 | EF474162.1 Psychrobacter sp. | 1448 | 99 |
| | HM629397.1 <i>Psychrobacter alimentarius</i> | | 99 |
| | AB688097.1 <i>Psychrobacter piscatorii</i> | | 99 |
| 2016 | AB680626.1 Alcaligenes faecalis | 1336 | 100 |
| | JN256919.1 <i>Alcaligenes sp.</i> | | 100 |
| | GQ266489.1 <i>Uncultured bacterium</i> | | 100 |
| 2024 | JF327442.1 Exiguobacterium oxidotolerans | 1415 | 100 |
| | HQ433569.1 <i>Uncultured bacterium</i> | | 100 |
| | EF530574.1 <i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> | | 100 |
| 8 | Psychrobacter sp. | 1037 | 98 |
| | <i>Psychrobacter faecalis</i> | 1037 | 98 |
| 16 | FR749849.1 Psychrobacter faecalis | 475 | 98 |
| | JN642258.1 <i>Psychrobacter faecalis</i> | 475 | 98 |
| 20 | EU878796.1 Staphylococcus sp. | 435 | 96 |
| 22 | JN969549.1 Staphylococcus equorum | 809 | 99 |
| 25 | JQ586268.1 Psychrobacter sp. | 846 | 99 |
| | JF766372.1 <i>Psychrobacter alimentarius</i> | 846 | 99 |
| 27 | JN871906.1 Morganella morganii | 754 | 97 |
| | <i>Morganella morganii</i> | | |
| | <i>Morganella morganii</i> | | |
| 30 | EF061903.1 Staphylococcus sp. | 793 | 97 |
| | FJ938162.1 <i>Staphylococcus sp.</i> | 791 | 96 |
| | JQ647888 <i>Staphylococcus equorum</i> | | 95 |
| 34 | DQ976371.1 Psychrobacter | 121 | 91 |
| 35 | JQ 406549.1 Pseudomonas sp | 606 | 94 |
| | JQ5955416.1 <i>Pseudomonas extramalistralis</i> | 606 | 94 |
| 38 | HM489989.1 Oceanimonas sp. | 723 | 98 |
| | AM983543.1 <i>Oceanisphaerae laurenicae</i> | 706 | 98 |
| 39 | EF471918.1 Staphylococcus sp. | 662 | 94 |
| | JN969599.1 <i>Staphylococcus equorum</i> | 654 | 94 |
| 40 | HQ1714412 <i>Oceanisphaera</i> | 911 | 97 |
| 42 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 963 | 99 |
| | JQ072044.1 <i>Staphylococcus sp</i> | 963 | 99 |
| 43 | AM 048842.2 Pseudomonas fluorescens | 220 | 94 |
| 47 | FJ613302.1 Psychrobacter faecalis | 544 | 95 |
| | EU434452.1 <i>Psychrobacter pulmonis</i> | 544 | 95 |
| 49 | JN411364.1 Microbacterium oxydans | 824 | 99 |
| | JN393006.1 <i>Microbacterium oxydans</i> | | |
| | JN 327481.1 <i>Microbacterium oxydans</i> | | |
| 52 | HM566011.1 Oceanisphaera sp | 706 | 99 |
| | HM489989.1 <i>Oceanisphaera sp</i> | 706 | 99 |
| | HM4889975.1 <i>Oceanisphaera sp</i> | 706 | 99 |
| 59 | JQ290008.1 Microbacterium oxydans | 715 | 99 |
| | JQ691553.1 <i>Microbacterium sp.</i> | 715 | 99 |
| 65 | JQ638351.1 Staphylococcus epidermis | 717 | 98 |
| | JQ638293.1 <i>Staphylococcus epidermis</i> | 717 | 98 |
| 69 | <i>Exiguobacterium</i> | | |
| 75 | JQ069959.1 Psychrobacter sp. | 970 | 97 |
| | JN642258.1 <i>Psychrobacter faecalis</i> | 970 | 97 |

| Código | Sequências com maior homologia e número de acesso no GenBank | Homologia (N) | Homologia% |
|--------|--|---------------|------------|
| 81 | HE575916.1 Shewnella sp | 459 | 96 |
| | AB681550.1 <i>Shewnella putrefaciens</i> | 459 | 96 |
| 1003 | FJ226423.1 Alcaligenes faecallis | 1181 | 96 |
| | JQ612523.1 <i>Alcaligenes faecallis</i> | 1175 | 96 |
| 1008 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 950 | 96 |
| | JQ072044.1 <i>Staphylococcus equorum</i> | 950 | |
| | JN969599.1 <i>Staphylococcus equorum</i> | 1077 | 94 |
| 1014 | JQ424344.1 Shewnella baltica | 1024 | 99 |
| | JQ424328.1 <i>Shewnella baltica</i> | 1024 | 99 |
| | JQ424326.1 <i>Shewnella baltica</i> | 1024 | 99 |
| 1021 | HE652098.2 Stenotrophomonas | 800 | 100 |
| | JQ072085.1 <i>Stenotrophomonas</i> | 800 | 100 |
| 1023 | JQ612523.1 Alcaligenes faecallis | 556 | 100 |
| | JN999870.1 <i>Alcaligenes faecallis</i> | 556 | 100 |
| | JN999870.1 <i>Alcaligenes faecallis</i> | 736 | 100 |
| 1025 | CP002811.1 Shewnella baltica | 763 | 96 |
| | HM489945.1 <i>Shewnella</i> | 767 | 96 |
| 1044 | JQ6938091 Ochrobacterium sp | 558 | 99 |
| 1048 | AM182568.1 Pseudomonas sp. | 102 | 90 |
| 1051 | JQ069959.1 Psychrobacter sp. | 926 | 98 |
| | JN 642258.1 <i>Psychrobacter faecallis</i> | 926 | 98 |
| 1066 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 835 | 97 |
| | JQ072044.1 <i>Staphylococcus sp</i> | 835 | 97 |
| 1068 | HE652098.2 Stenotrophomoas sp. | 1219 | 96 |
| | HQ 224661.1 <i>Stenotrophomoas maltophilia</i> | 1219 | 96 |
| | JF 711015.1 <i>Stenotrophomoas rhizophila</i> | 1219 | 96 |
| 1072 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 800 | 99 |
| | JQ072044.1 <i>Staphylococcus sp.</i> | 800 | 99 |
| 1074 | EF154276.1 Psychrobacter alimentarius | 357 | 90 |
| | JQ586268.1 <i>Psychrobacter sp.</i> | 353 | 90 |
| 1077 | JQ691541.1 Psychrobacter | 59 | 100 |
| 1078 | JN8718931 Psychrobacter alimentarius | 658 | 98 |
| | JQ586268.1 <i>Psychrobacter sp.</i> | 652 | 98 |
| 1093 | JF682513.1 Alcaligenes faecallis | 1057 | 97 |
| | JN828951.1 <i>Alcaligenes faecallis</i> | 1057 | 97 |
| 1094 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 953 | 96 |
| | JQ072044.1 <i>Staphylococcus sp.</i> | 953 | 96 |
| 1106 | JF682513.1 Alcaligenes faecallis | 676 | 99 |
| | JQ246913.1 <i>Alcaligenes sp.</i> | 676 | 99 |
| 2005 | JQ612523.1 Alcaligenes faecallis | 771 | 99 |
| | JN999870.1 <i>Alcaligenes faecallis</i> | 771 | 99 |
| 2008 | JQ246817.1 Alcaligenes faecallis | 204 | 90 |
| | JN 374993.1 <i>Alcaligenes sp.</i> | 207 | 90 |
| 2010 | JQ586268.1 Psychrobacter sp. | 1075 | 95 |
| | JN864011.1 <i>Psychrobacter sp</i> | 1075 | 95 |
| 2011 | AB550521.1 Psychrobacter sp. | 994 | 95 |
| | JF711000.1 <i>Psychrobacter namhaensis</i> | 994 | 95 |
| 2018 | JQ612523.1 Alcaligenes faecalis | 446 | 94 |
| | JQ612515.1 <i>Alcaligenes faecalis</i> | 446 | 94 |
| 2021 | AB547328.1 Alcaligenes faecalis | 338 | 90 |

| Código | Sequências com maior homologia e número de acesso no GenBank | Homologia (N) | Homologia% |
|--------|--|---------------|------------|
| 2025 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 1112 | 96 |
| | JQ072044.1 Staphylococcus sp. | 1112 | 96 |
| 2028 | HM212666.1 Psychrobacter sanguinis | 976 | 96 |
| | HM212667.1 Psychrobacter sanguinis | 976 | 96 |
| 2029 | EU878991.1 Methylobacterium | 69,4 | 88 |
| | JN053528.1 Brurkheldaria sp. | 67,6 | 83 |
| | FN 645747.1 Achromobacter sp. | 63,9 | 86 |
| 2034 | HM212666.1 Psychrobacter sanguinis | 586 | 96 |
| | HM 212667.1 Psychrobacter sanguinis | | |
| 2037 | NR 027204.1 Psychrobacter arenosus | 1055 | 97 |
| | HM212666.1 Psychrobacter sanguinis | 1022 | 96 |
| 2038 | JN8718931 Psychrobacter alimentarius | 623 | 97 |
| | JQ586268.1 Psychrobacter sp. | 623 | 97 |
| 2040 | JQ660298.1 Staphylococcus epidermis | 918 | 97 |
| | 797AB704413.1 Staphylococcus sp. | 918 | 97 |
| 2042 | EF471918.1 Staphylococcus sp. | 409 | 93 |
| | Staphylococcus epidermis | 401 | 92 |
| 2044 | JQ 647888.1 Staphylococcus equorum | 464 | 99 |
| | JN969599.1 Staphylococcus equorum | | |
| 2047 | JQ069959.1 Psychrobacter sp. | 970 | 98 |
| | JN642258.1 Psychrobacter faecalis | 970 | 98 |
| 2051 | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 859 | 96 |
| | JQ072044.1 Staphylococcus sp. | 859 | 96 |
| 2054 | JN602254.1 Psychrobacter sp. | 1055 | 99 |
| | JN602252.1 Psychrobacter sp. | 1055 | 99 |
| | JF711008.1 Psychrobacter celer | 1055 | 99 |
| 57 | JQ236807.1 Pseudomonas fluorescens | 893 | 99 |
| 66 | JQ236807.1 Pseudomonas fluorescens | 817 | 98 |
| 79 | JQ236807.1 Pseudomonas fluorescens | 941 | 96 |
| 1030 | JQ236807.1 Pseudomonas fluorescens | 941 | 96 |
| 1053 | AB633203.1 Pseudomonas sp. | 1029 | 99 |
| 2000 | JN208126.1 Psychrobacter piscatori | 739 | 92 |
| 1 | JQ799115.1 Shewnella baltica | 1192 | 97 |
| | JQ424344.1 Shewnella baltica | 1192 | 97 |
| | JQ424328.1 Shewnella baltica | 1192 | 97 |
| 4 | Uncultured Bacteria | | |
| | JQ349476.1 Uncultured Psychrobacter | 1138 | 95 |
| | HM584290.1 Psychrobacter sp. | 1138 | 95 |
| 6 | JQ337402.1 Psychrobacter | 1085 | 95 |
| | JN864011.1 Psychrobacter | 1085 | 95 |
| | JN315775.1 Psychrobacter | 1085 | 95 |
| 13 | Uncultured bacteria | 1112 | 97 |
| | JQ069959.1 Psychrobacter | 1110 | 97 |
| | Uncultured bacteria | 1110 | 97 |
| 48 | HQ910725.1 Uncultured bacterium | | |
| | AF479346.1 Glacial ice bacterium | | |
| | JQ890539.1 Microbacterium oxydans | 1057 | 97 |
| 50 | FJ 672773.1 Uncultured | 1110 | 97 |
| | JQ069959.1 Psychrobacter sp. | 1109 | 97 |
| | HQ860468.1 Uncultured | 1109 | 97 |

| Código | Sequências com maior homologia e número de acesso no GenBank | Homologia (N) | Homologia% |
|--------|--|---------------|------------|
| 51 | HM566011.1 Ocaisphaera | 1118 | 95 |
| | HM489989.1 Oceanimonas | 1112 | 95 |
| | HQ340607.1 Oceanisphaera | 1096 | 95 |
| 55 | AF468390.1 Artic sea ice bacterium | 1138 | 93 |
| | NR043141.1 Psychrobacter namhaensis | 1138 | 93 |
| | AY553082.1 Psychrobacter sp. | 1134 | 95 |
| 71 | NR027204.1 Psychrobacter arenosus | 1140 | 95 |
| | GQ370385.1 Psychrobacter sp. | 1134 | 95 |
| | HQ860490.1 Uncultured bacterium | 1125 | 95 |
| 1007 | JX005892.1 Sphingobacterium sp. | 1133 | 96 |
| | JN592609.1 Sphingobacterium sp. | 1133 | 96 |
| | HM352374.1 Sphingobacterium sp. | 1133 | 96 |
| 1022 | AB369044.1 Uncultured bacterium | 850 | 96 |
| | JN088183.1 Delftia sp. | 845 | 96 |
| | JQ923599.1 Uncultures | 845 | 96 |
| 1041 | JF225020.1 Uncultured bacteria | 1206 | 98 |
| | AP009152.1 Kokuria rhizophila | 3620 | 98 |
| | AR274746.1 Kokuria rhizophila | 1206 | 98 |
| 1042 | JF225020.1 Uncultured bacteria | 839 | 94 |
| | AP009152.1 Kokuria rhizophila | 2518 | 94 |
| | AB274746.1 Kokuria rhizophila | 2518 | 94 |
| 1059 | JF096644.1 Uncultured bacteria | 1123 | 98 |
| | JF096644.1 Uncultured bacteria | 1123 | 98 |
| | HM489953.1 Exiguobacterium sp. | 1123 | 98 |
| 1103 | FJ938162.1 Staphylococcus sp. | 1048 | 98 |
| | HM306327.1 Uncultured | 1048 | 98 |
| | AB715345.1 Staphylococcus sp. | 1042 | 98 |
| 2013 | EU365501.1 Psychrobacter sp. | 1120 | 95 |
| | JQ432568.1 Uncultured marine | 1114 | 95 |
| | JQ349475.1 Uncultured marine | 1114 | 95 |
| 2027 | FJ200402.2 Microbacterium | 763 | 95 |
| | JX011355.1 Uncultured actinobacterium | 761 | 95 |
| | FJ950588.1 Stenotrophomonas maltophilia | 291 | 88 |
| | FJ950597.1 Stenotrophomonas maltophilia | 289 | 88 |
| | FJ950544.1 Stenotrophomonas maltophilia | 289 | 91 |
| 2050 | AB715345.1 Staphylococcus sp. | 876 | 95 |
| | JQ762304.1 Staphylococcus sp. | 876 | 95 |
| | JN969599.1 Staphylococcus equorum | 876 | 95 |

Tabela 2 - Distribuição do número de estirpes por gêneros obtidos na identificação por pirosequência segundo as diferentes amostras de bacalhau de origem (CB_P: bacalhau cura branca; CA_3sP: bacalhau cura amarela 3 semanas; CA_3mP: bacalhau cura amarela 3 meses)

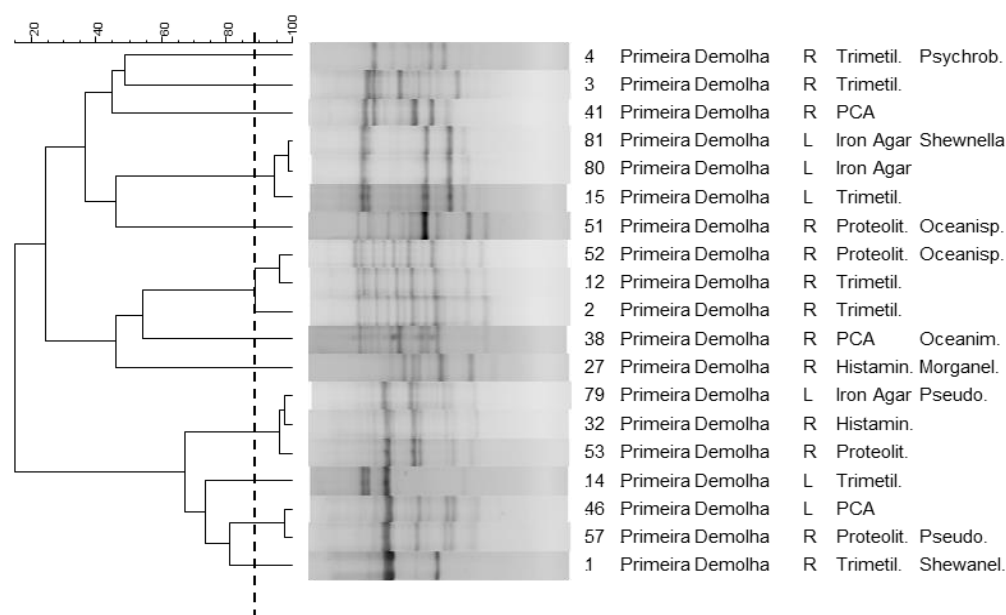
| Gram Positivas | CB_P | CA_3sP | CA_3mP |
|-----------------------------|------|--------|--------|
| <i>Mrinococcus</i> spp. | 1 | 1 | 3 |
| <i>Salimicrobium</i> spp. | 1 | 3 | 3 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 1 | 4 | 5 |
| <i>Salinicoccus</i> spp. | 1 | 0 | 2 |
| <i>Clostridia</i> spp. | 0 | 1 | 1 |
| <i>Bacillus</i> spp. | 0 | 2 | 0 |
| <i>Exiguobacterium</i> spp. | 0 | 1 | 0 |
| <i>Planococcus</i> spp. | 0 | 1 | 1 |
| <i>Arthrobacter</i> spp. | 0 | 1 | 1 |
| <i>Kokuria</i> spp. | 0 | 1 | 0 |
| <i>Vagococcus</i> spp. | 0 | 0 | 2 |
| <i>Ornithinococcus</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Dietzia</i> spp. | 0 | 0 | 1 |

| Gram negativas | CB_P | CA_3sP | CA_3mP |
|-------------------------------|------|--------|--------|
| <i>Chromohalobacter</i> spp. | 2 | 1 | 1 |
| <i>Halomonas</i> spp. | 3 | 5 | 4 |
| <i>Cobetia</i> spp. | 2 | 0 | 1 |
| <i>Vibrio</i> spp. | 2 | 1 | 0 |
| <i>Psychrobacter</i> spp. | 3 | 4 | 3 |
| <i>Burkholderia</i> spp. | 0 | 1 | 0 |
| <i>Paracoccus</i> spp. | 0 | 1 | 0 |
| <i>Pseudoalteromonas</i> spp. | 0 | 1 | 1 |
| <i>Photobacterium</i> spp. | 0 | 2 | 0 |
| <i>Veillonellaceae</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Oscillospiraceae</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Alkalibacterium</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Chryseobacterium</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Variovara</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Phyllobacterium</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Rhodobacter</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Shewanella</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Oceanisphaera</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Desulfovibrio</i> spp. | 0 | 0 | 1 |
| <i>Alcaligenes</i> spp. | 0 | 0 | 0 |
| <i>Stenothrophomonas</i> spp. | 0 | 0 | 0 |

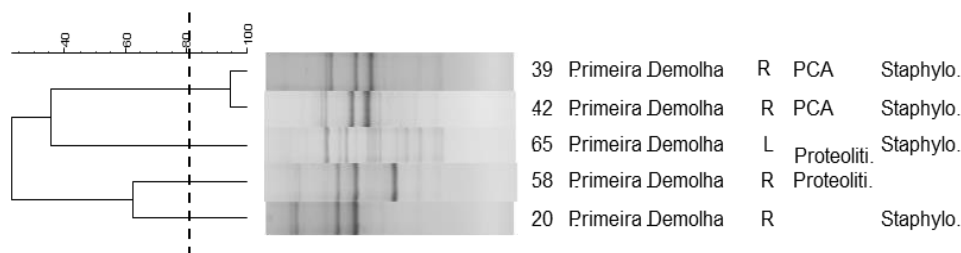
ANEXO IV

A- PCR FINGERPRINTING DO ESTUDO DO PROCESSO DE CURA AMARELA

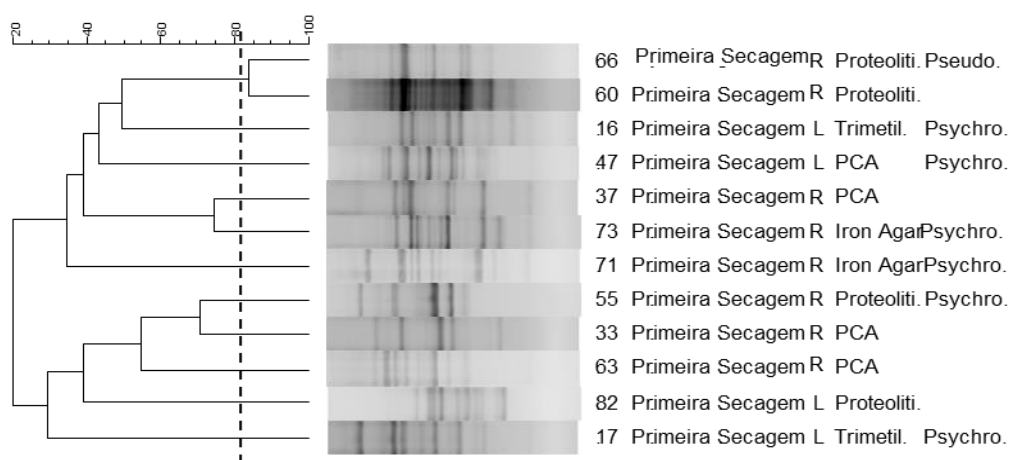
a) Dendrograma Bactérias Gram -



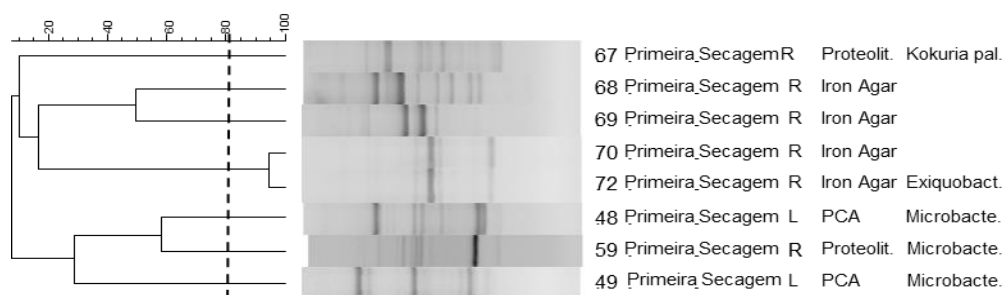
b) Dendrograma Bactérias Gram +



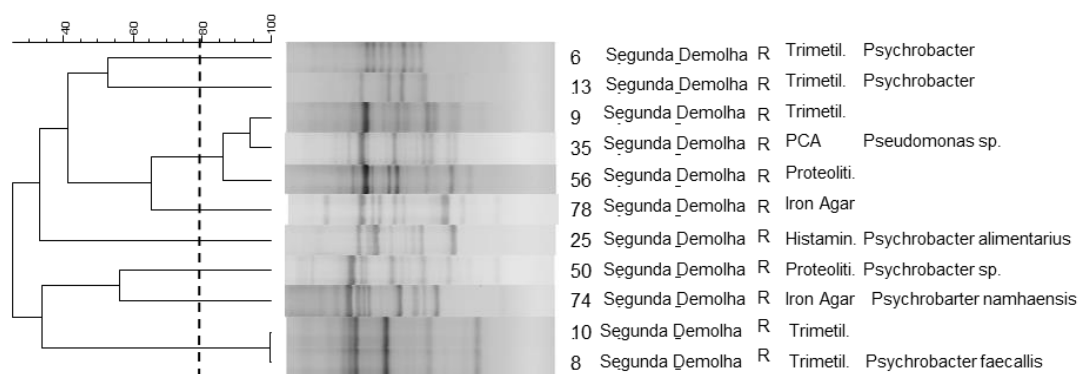
c) Dendrograma Bactérias Gram -



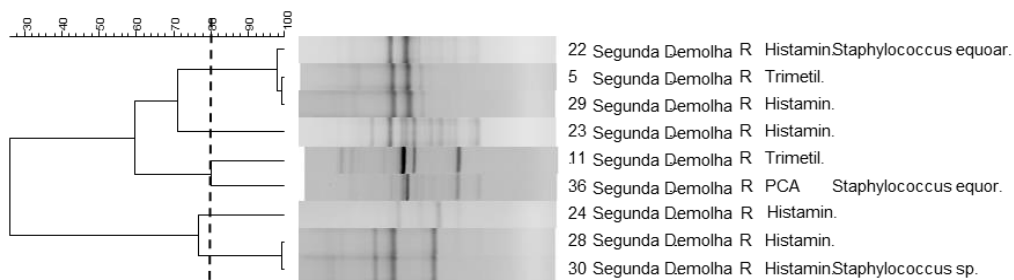
d) Dendrograma Bactérias Gram +



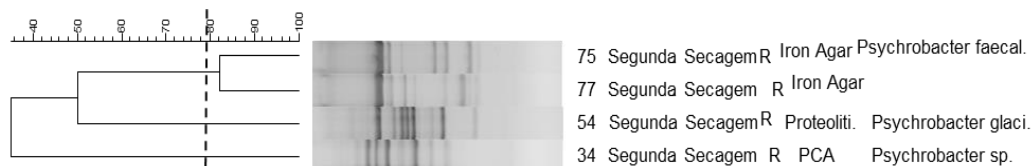
e) Dendrograma Bactérias Gram -



f) Dendrograma Bactérias Gram +

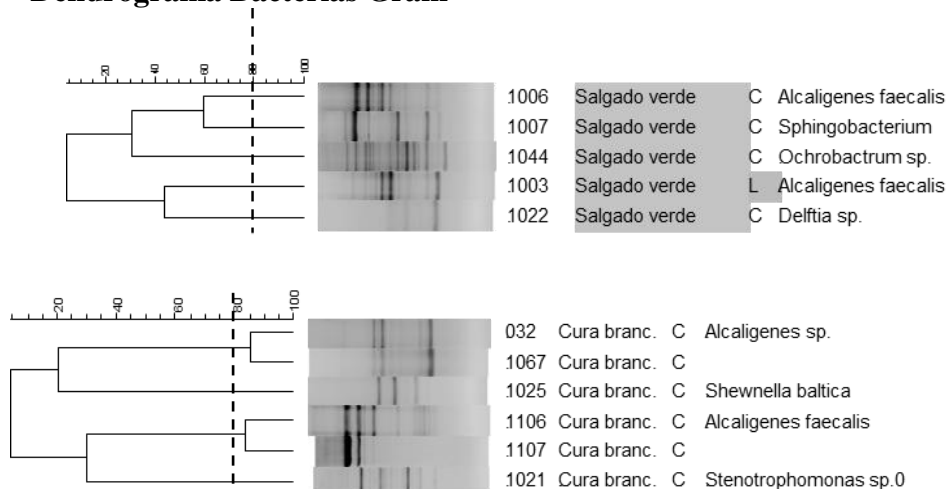


g) Dendrograma Bactérias Gram -

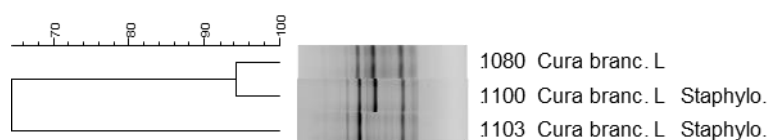


B- PCR FINGERPRINTING DO ESTUDO DA COMPARAÇÃO DO BACALHAU DE CURA AMARELA COM O BACALHAU DE CURA BRANCA

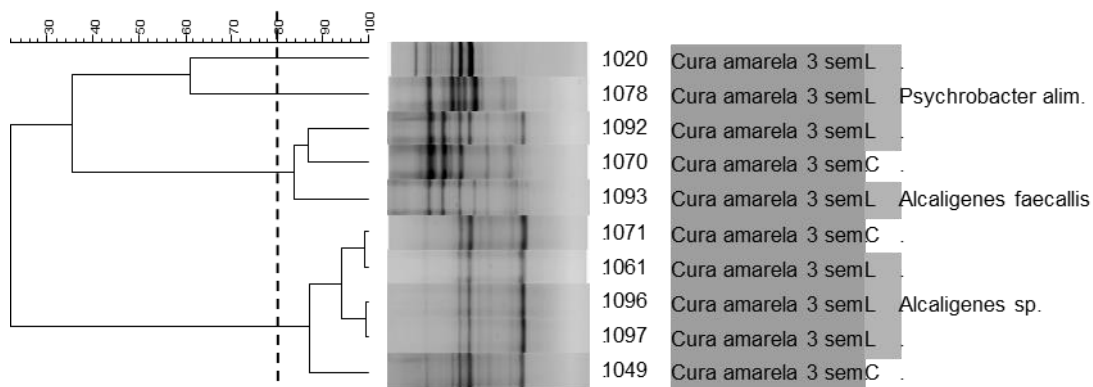
h) Dendrograma Bactérias Gram -



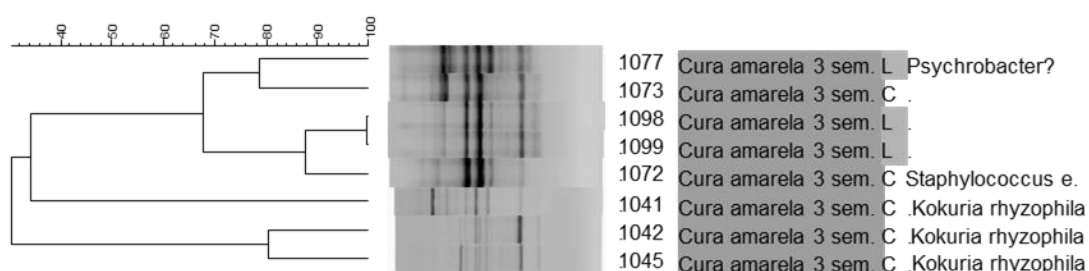
i) Dendrograma Bactérias Gram +



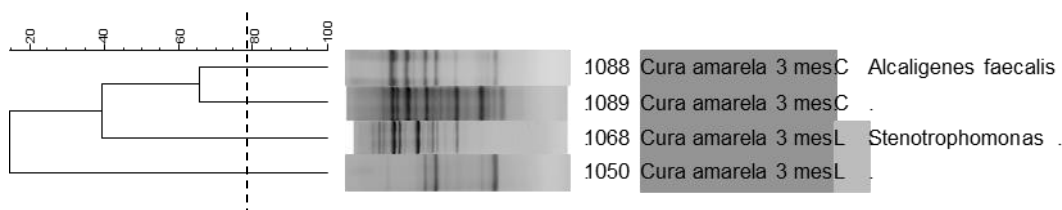
j) Dendrograma Bactérias Gram -



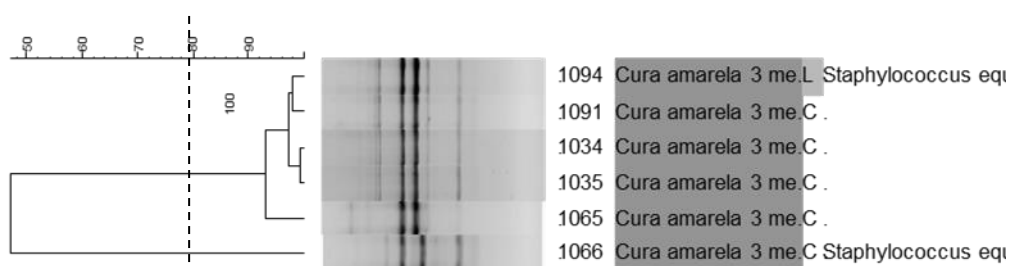
k) Dendrograma Bactérias Gram +



l) Dendrograma Bactérias Gram -

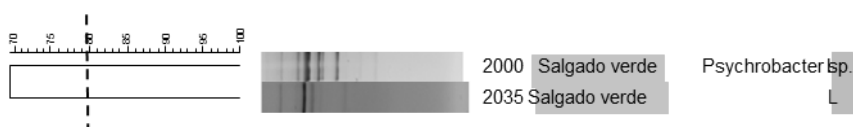


m) Dendrograma Bactérias Gram +



B - PCR FINGERPRINTING DO ESTUDO SOBRE A ESTABILIDADE DO BACALHAU DE CURA AMARELA

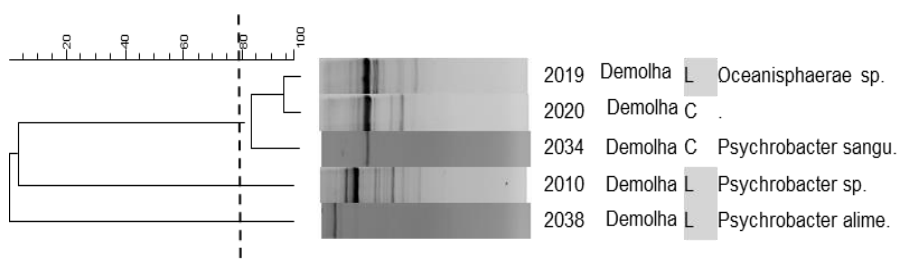
a) Dendrograma Bactérias Gram -



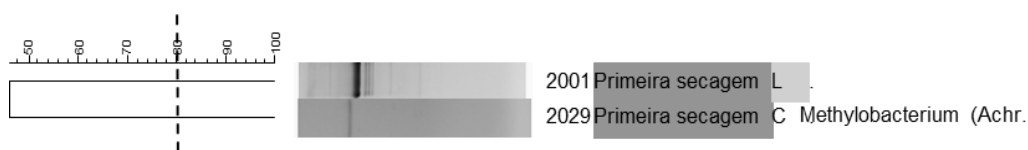
b) Dendrograma Bactérias Gram +



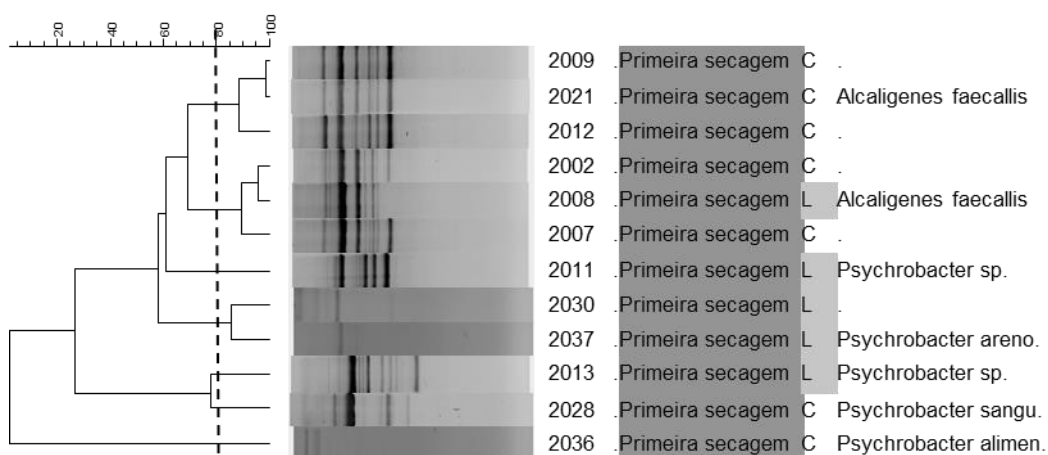
c) Dendrograma Bactérias Gram -



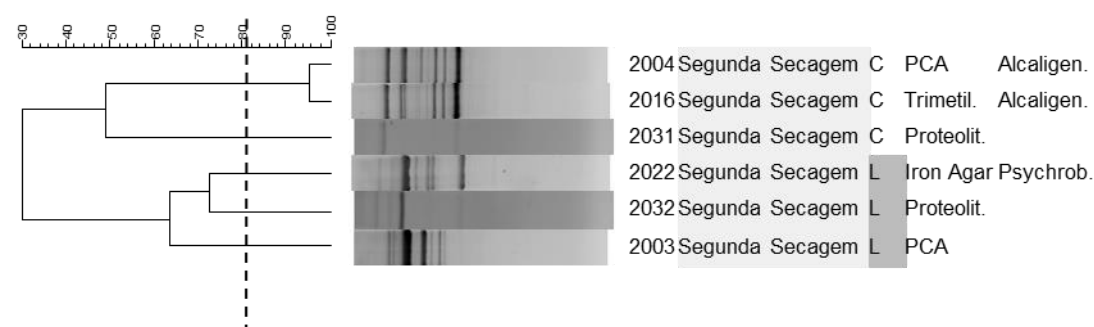
d) Dendrograma Bactérias Gram +



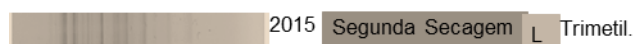
e) Dendrograma Bactérias Gram -



f) Dendrograma Bactérias Gram -



g) Dendrograma Bactérias Gram -



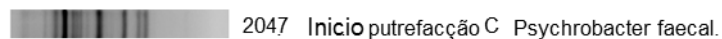
h) Dendrograma Bactérias Gram -



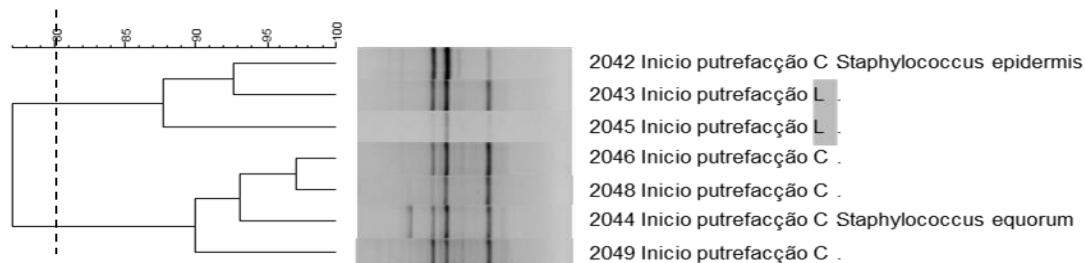
i) Dendrograma Bactérias Gram +



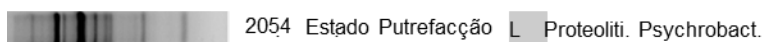
j) Dendrograma Bactérias Gram -



k) Dendrograma Bactérias Gram +



l) Dendrograma Bactérias Gram -

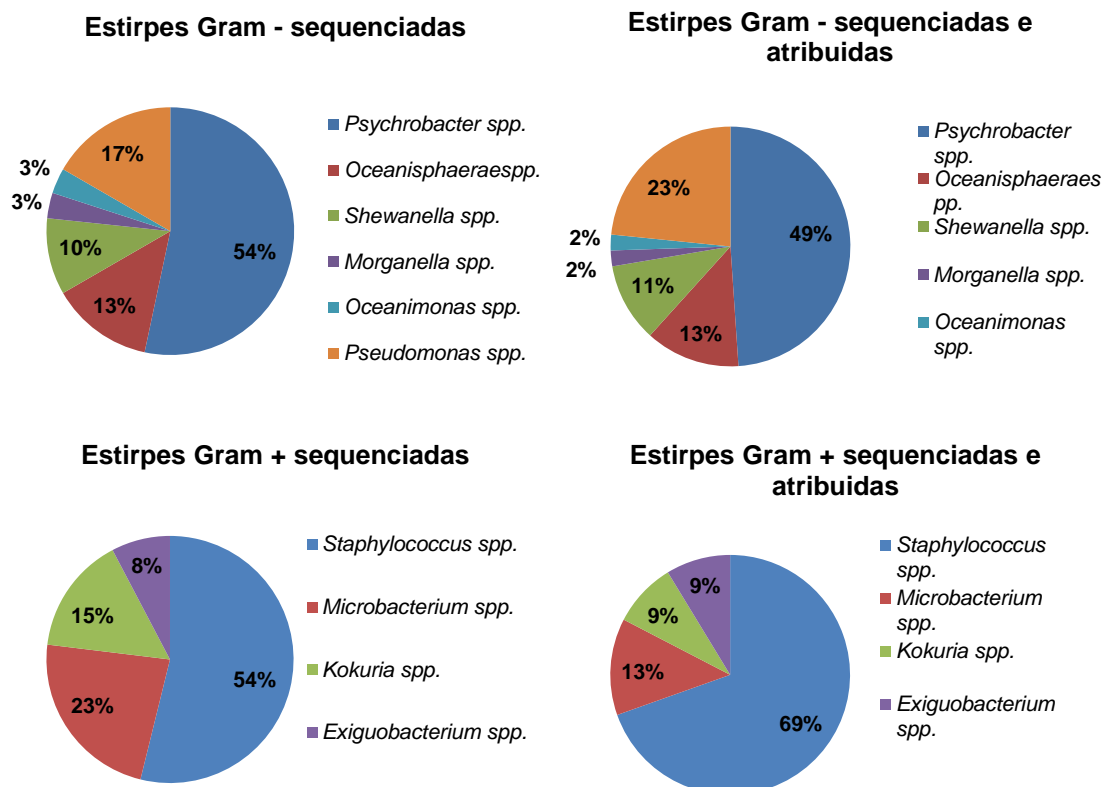


m) Dendrograma Bactérias Gram +

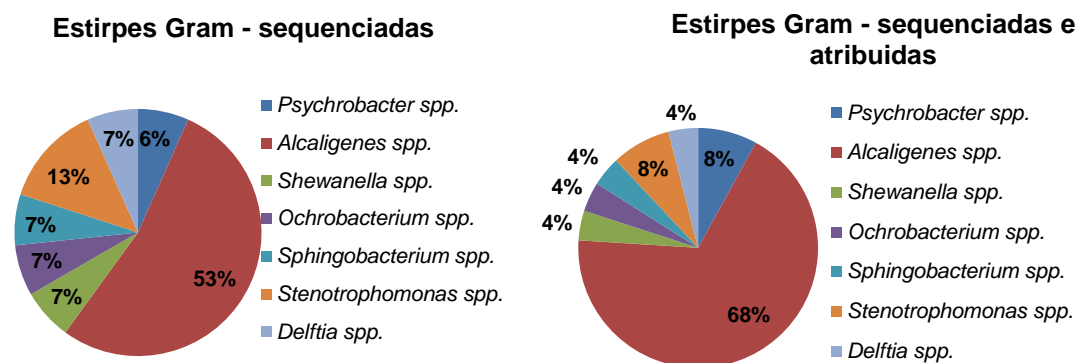


C - COMPARAÇÃO ENTRE A IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES OBTIDA PELA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S rDNA E A IDENTIFICAÇÃO ATRIBUÍDA COM BASE NA SEQUENCIAÇÃO E DA PERCENTAGEM DE SEMELHANÇA DO PCR FINGERPRINTING.

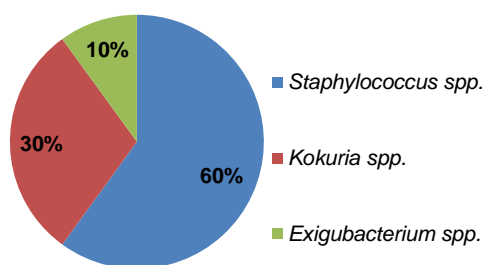
a) Ensaio 2: estudo da evolução da população microbiana ao longo do processo de cura amarela -



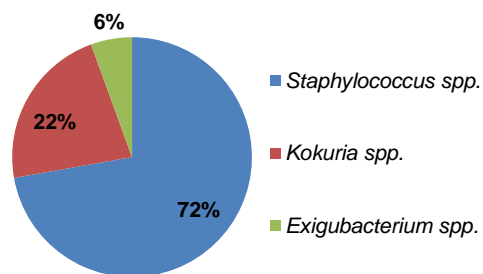
b) Ensaio 3: comparação entre o bacalhau de cura branca e cura amarela



Estirpes Gram + sequenciadas

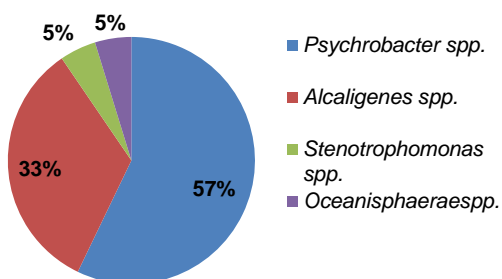


Estirpes Gram + sequenciadas e atribuídas

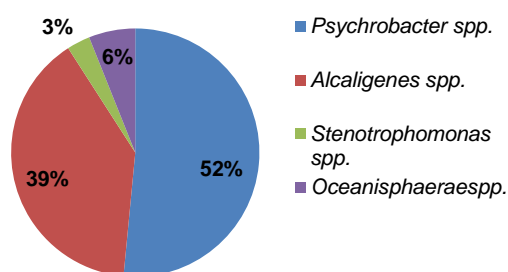


c) Ensaio 5: estudo da estabilidade do bacalhau de cura amarela

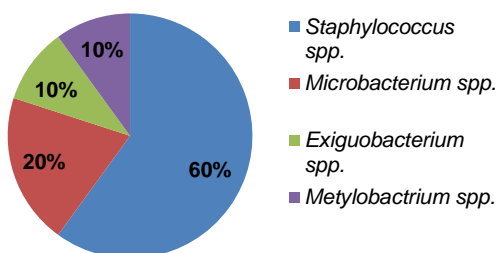
Estirpes Gram - sequenciadas



Estirpes Gram - sequenciadas e atribuídas



Estirpes Gram + sequenciadas



Estirpes Gram + sequenciadas e atribuídas

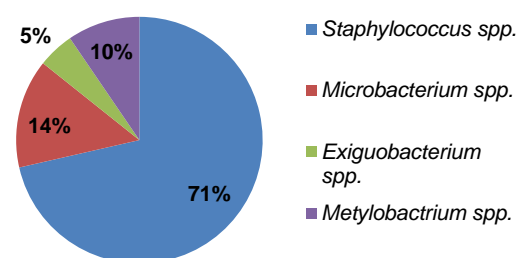


Tabela A - Determinação dos índices de diversidade de Simpson e Shannon Wiener, por fase do processo de elaboração do Bacalhau de cura amarela – ENSAIO 2

| | Gram - | | | | | Gram + | | | | |
|-----------------------------------|-------------|-----------|---------|---------|------|-------------|-----------|---------|---------|------|
| | Nº Estirpes | Nº grupos | Simpson | Shannon | J' | Nº Estirpes | Nº grupos | Simpson | Shannon | J' |
| Salgado Verde | 2 | 2 | 1,00 | 0,30 | 1,00 | | | | | |
| Primeira Demolha | 19 | 11 | 0,93 | 0,98 | 0,94 | 5 | 4 | 0,90 | 0,58 | 0,96 |
| Primeira Secagem | 12 | 11 | 0,98 | 1,00 | 0,99 | 8 | 7 | 0,96 | 0,83 | 0,98 |
| Segunda Demolha | 11 | 8 | 0,93 | 0,86 | 0,95 | 9 | 5 | 0,86 | 0,66 | 0,95 |
| Segunda secagem/ produto final | 4 | 3 | 0,83 | 0,45 | 0,95 | | | | | |

Legenda: j' valor que resulta da divisão do índice de Shannon Wiener pelo logaritmo do número máximo de grupos de cada fase; Os índices variam entre 0 e 1

Apenas foi isolada uma estirpe Gram + na fase de salgado verde e nenhuma na fase de segunda secagem/produto final.

Tabela B - Índices de diversidade de Simpson e Shannon Wiener, por produto final de cura branca, cura amarela e cura amarela com 3 meses de maturação– ENSAIO 3

| | Gram - | | | | | Gram + | | | | |
|------------------------|-------------|-----------|---------|---------|------|-------------|-----------|---------|---------|------|
| | Nº Estirpes | Nº grupos | Simpson | Shannon | J'* | Nº Estirpes | Nº grupos | Simpson | Shannon | J' |
| Salgado Verde | 5 | 5 | 1,00 | 0,70 | 1,00 | 2 | 2 | 1,00 | 0,30 | 1,00 |
| Cura Branca | 6 | 4 | 0,87 | 0,58 | 0,96 | 3 | 2 | 1,00 | 0,48 | 1,00 |
| Cura amarela 3 semanas | 10 | 4 | 0,71 | 0,51 | 0,84 | 7 | 4 | 0,81 | 0,55 | 0,92 |
| Cura amarela 3 meses | 4 | 4 | 1,00 | 0,60 | 1,00 | 6 | 2 | 0,33 | 0,20 | 0,65 |

* Legenda: j' valor que resulta da divisão do índice de Shannon Wiener pelo logaritmo do número máximo de grupos de cada fase; Os índices variam entre 0 e 1

Tabela C - Índices de diversidade de Simpson e Shannon Wiener, por fase do processo de elaboração do Bacalhau de cura amarela e fases de putrefacção– ENSAIO 5

| | Gram - | | | | | Gram + | | | | |
|--------------------|-------------|-----------|---------|---------|------|-------------|-----------|---------|---------|------|
| | Nº Estirpes | Nº grupos | Simpson | Shannon | J' | Nº Estirpes | Nº grupos | Simpson | Shannon | J' |
| Salgado verde | 2 | 2 | 1,00 | 0,30 | 1,00 | 2 | 2 | 1,00 | 0,30 | 1,00 |
| Demolha | 5 | 3 | 0,70 | 0,41 | 0,86 | | | | | |
| 1ª secagem | 12 | 7 | 0,89 | 0,79 | 0,94 | 2 | 2 | 1,00 | 0,30 | 1,00 |
| 2ª secagem | 6 | 5 | 0,93 | 0,68 | 0,97 | | | | | |
| 3ª secagem | 6 | 3 | 0,73 | 0,44 | 0,92 | 2 | 2 | 1,00 | 0,30 | 1,00 |
| Início putrefacção | | | | | | 7 | 2 | 0,57 | 0,30 | 0,99 |
| Putrefacção | | | | | | 6 | 1 | 0,00 | 0,00 | |

Legenda: j' valor que resulta da divisão do índice de Shannon Wiener pelo logaritmo do número máximo de grupos de cada fase; Os índices variam entre 0 e 1

ANEXO V

ANÁLISE EM COMPONENTES PRINCIPAIS – TABELAS DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

1- Estudo do processo de cura amarela e fases de alteração (início de putrefacção e putrefacção)

| | %H | %Cl | ABVT_mgN | TMA_mgN | Log_AT | Log_BLA | Log_BH2S |
|----------|---------|---------|----------|----------|---------|---------|----------|
| %H | 1.0000 | | | | | | |
| %Cl | -0.4371 | 1.0000 | | | | | |
| ABVT_mgN | -0.3997 | 0.1066 | 1.0000 | | | | |
| TMA_mgN | -0.1126 | 0.1588 | 0.8344 | 1.0000 | | | |
| Log_AT | -0.1593 | -0.2668 | 0.4549 | 0.4698 | 1.0000 | | |
| Log_BLA | 0.0481 | -0.1578 | -0.0087 | 0.0186 | 0.4062 | 1.0000 | |
| Log_BH2S | 0.8668 | -0.5293 | -0.2645 | -0.1120 | 0.1556 | 0.1764 | 1.0000 |
| Log_BH | 0.6905 | -0.5913 | -0.3368 | -0.2896 | 0.3243 | 0.3711 | 0.8351 |
| Log_BP | 0.0180 | -0.2834 | -0.1308 | -0.1606 | 0.6251 | 0.3780 | 0.3536 |
| Log_Baf | -0.1735 | -0.1687 | -0.0572 | -0.2515 | 0.4615 | -0.0691 | 0.1083 |
| Log_BTMA | -0.1314 | -0.3972 | 0.4461 | 0.3372 | 0.8389 | 0.0194 | 0.1956 |
| %Psy | -0.1700 | -0.2579 | -0.0745 | 0.0130 | 0.3440 | 0.2426 | -0.1903 |
| %Ocph | 0.2106 | 0.4441 | -0.1824 | -0.0460 | -0.5689 | -0.1032 | -0.0343 |
| %Shew | 0.5375 | -0.3366 | -0.1301 | -0.2054 | -0.1335 | -0.0841 | 0.6893 |
| %Morg | 0.5830 | 0.0417 | 0.0895 | 0.5057 | 0.0649 | -0.0714 | 0.4124 |
| %Ocean | 0.5830 | 0.0417 | 0.0895 | 0.5057 | 0.0649 | -0.0714 | 0.4124 |
| %Pseu | 0.1495 | 0.1519 | -0.1891 | -0.1876 | -0.2984 | 0.0550 | 0.1357 |
| %Staph | -0.1923 | -0.0201 | 0.8248 | 0.6763 | 0.3458 | 0.1182 | -0.0692 |
| %MicrB | -0.0276 | -0.3208 | -0.3571 | -0.2929 | -0.3545 | -0.1472 | -0.2319 |
| %Kok | -0.1674 | 0.3538 | -0.1427 | -0.1465 | -0.3361 | -0.0900 | -0.2666 |
| %Exiguo | -0.3484 | 0.1744 | -0.0344 | -0.0531 | 0.2593 | -0.1045 | -0.1503 |
| %Alcag | -0.1000 | -0.1038 | -0.1320 | -0.2852 | 0.3303 | -0.1216 | 0.1393 |
| %Stentp | -0.2046 | 0.0555 | -0.0509 | -0.2008 | 0.1618 | -0.0714 | -0.0097 |
| %Metylb | 0.1450 | -0.1538 | -0.1654 | -0.1424 | 0.2166 | -0.0714 | 0.0085 |
| pH | 0.0658 | -0.1454 | 0.6727 | 0.5509 | 0.1661 | -0.4096 | 0.0854 |
| | Log_BH | Log_BP | Log_Baf | Log_BTMA | %Psy | %Ocph | %Shew |
| Log_BH | 1.0000 | | | | | | |
| Log_BP | 0.4218 | 1.0000 | | | | | |
| Log_Baf | 0.2680 | 0.6992 | 1.0000 | | | | |
| Log_BTMA | 0.3130 | 0.4797 | 0.6185 | 1.0000 | | | |
| %Psy | 0.0654 | 0.1425 | -0.0888 | 0.2562 | 1.0000 | | |
| %Ocph | -0.1464 | -0.4687 | -0.3602 | -0.5446 | -0.3137 | 1.0000 | |
| %Shew | 0.4918 | 0.0821 | -0.1524 | -0.0440 | -0.3467 | -0.0696 | 1.0000 |
| %Morg | 0.0604 | 0.0355 | -0.1748 | -0.0684 | -0.2238 | 0.1832 | 0.1102 |
| %Ocean | 0.0604 | 0.0355 | -0.1748 | -0.0684 | -0.2238 | 0.1832 | 0.1102 |
| %Pseu | 0.0383 | -0.0174 | -0.2504 | -0.5300 | -0.3961 | -0.1586 | 0.3578 |
| %Staph | -0.1653 | -0.2524 | -0.1542 | 0.3921 | -0.2309 | -0.2103 | 0.0813 |
| %MicrB | -0.2646 | -0.2098 | -0.2206 | -0.2046 | 0.3014 | -0.1321 | -0.1734 |
| %Kok | -0.2795 | -0.1361 | -0.1613 | -0.5379 | -0.2769 | -0.1300 | -0.1060 |
| %Exiguo | -0.1935 | 0.5260 | 0.4786 | 0.2452 | -0.1837 | -0.1509 | -0.1230 |
| %Alcag | 0.2730 | 0.5805 | 0.9394 | 0.4910 | -0.1655 | -0.1756 | -0.1432 |
| %Stentp | -0.0558 | 0.4945 | 0.6661 | 0.2944 | -0.3072 | -0.1032 | -0.0841 |
| %Metylb | 0.4162 | 0.0201 | 0.2275 | 0.2119 | 0.2655 | -0.1032 | -0.0841 |
| pH | -0.0318 | -0.3063 | 0.0928 | 0.4120 | -0.4000 | 0.0259 | 0.1376 |
| | %Morg | %Ocean | %Pseu | %Staph | %MicrB | %Kok | %Exiguo |
| %Morg | 1.0000 | | | | | | |
| %Ocean | 1.0000 | 1.0000 | | | | | |
| %Pseu | 0.0372 | 0.0372 | 1.0000 | | | | |
| %Staph | 0.0891 | 0.0891 | -0.1692 | 1.0000 | | | |
| %MicrB | -0.1472 | -0.1472 | -0.2180 | -0.1849 | 1.0000 | | |
| %Kok | -0.0900 | -0.0900 | 0.8700 | -0.2505 | -0.1037 | 1.0000 | |
| %Exiguo | -0.1045 | -0.1045 | -0.0190 | -0.1519 | -0.0182 | 0.0702 | 1.0000 |
| %Alcag | -0.1216 | -0.1216 | -0.2436 | -0.2385 | -0.2506 | -0.1531 | 0.3015 |
| %Stentp | -0.0714 | -0.0714 | -0.1431 | -0.0227 | -0.1472 | -0.0900 | 0.7403 |
| %Metylb | -0.0714 | -0.0714 | -0.1431 | -0.1988 | -0.1472 | -0.0900 | -0.1045 |
| pH | 0.2388 | 0.2388 | -0.2135 | 0.6538 | -0.3482 | -0.2350 | -0.1402 |
| | %Alcag | %Stentp | %Metylb | pH | | | |
| %Alcag | 1.0000 | | | | | | |
| %Stentp | 0.4863 | 1.0000 | | | | | |
| %Metylb | 0.1823 | -0.0714 | 1.0000 | | | | |
| pH | 0.0940 | 0.0844 | 0.1256 | 1.0000 | | | |

2- Estudo da estabilidade do bacalhau de cura amarela (comparação produto final, início de putrefacção e putrefacção)

| | %H | %Cl | ABVTimgN | TMAimgN | LogIAT | LogIBH2S | LogIBH |
|-----------|---------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|
| %H | 1.0000 | | | | | | |
| %Cl | 0.8941 | 1.0000 | | | | | |
| ABVTimgN | -0.7129 | -0.9515 | 1.0000 | | | | |
| TMAimgN | -0.9047 | -0.9997 | 0.9437 | 1.0000 | | | |
| LogIAT | -0.7973 | -0.4425 | 0.1451 | 0.4642 | 1.0000 | | |
| LogIBH2S | 0.9301 | 0.9961 | -0.9206 | -0.9980 | -0.5199 | 1.0000 | |
| LogIBH | 0.9301 | 0.9961 | -0.9206 | -0.9980 | -0.5199 | 1.0000 | 1.0000 |
| LogIBP | 0.9940 | 0.9378 | -0.7855 | -0.9460 | -0.7262 | 0.9648 | 0.9648 |
| LogIBaf | 0.9748 | 0.9715 | -0.8514 | -0.9770 | -0.6425 | 0.9886 | 0.9886 |
| LogIBTMA | 0.9991 | 0.9124 | -0.7421 | -0.9221 | -0.7708 | 0.9449 | 0.9449 |
| 1.ª linha | | | | | | | |
| %Psy | -0.9301 | -0.9961 | 0.9206 | 0.9980 | 0.5199 | -1.0000 | -1.0000 |
| %Staph | -0.9301 | -0.9961 | 0.9206 | 0.9980 | 0.5199 | -1.0000 | -1.0000 |
| %Exiguo | 0.9301 | 0.9961 | -0.9206 | -0.9980 | -0.5199 | 1.0000 | 1.0000 |
| %Alcag | 0.9301 | 0.9961 | -0.9206 | -0.9980 | -0.5199 | 1.0000 | 1.0000 |
| %Stentp | 0.9301 | 0.9961 | -0.9206 | -0.9980 | -0.5199 | 1.0000 | 1.0000 |
| pH | -0.9301 | -0.9961 | 0.9206 | 0.9980 | 0.5199 | -1.0000 | -1.0000 |
| aaimgN | 0.4364 | -0.0127 | 0.3198 | -0.0116 | -0.8911 | 0.0755 | 0.0755 |
| ChQIcz | 0.1950 | -0.2649 | 0.5487 | 0.2414 | -0.7475 | -0.1788 | -0.1788 |
| ChFerIcz | -0.6888 | -0.9405 | 0.9994 | 0.9320 | 0.1116 | -0.9069 | -0.9069 |
| ChPIcz | -0.7257 | -0.9570 | 0.9998 | 0.9496 | 0.1633 | -0.9277 | -0.9277 |
| ChFerIcr | -0.7930 | -0.4362 | 0.1381 | 0.4579 | 1.0000 | -0.5138 | -0.5138 |
| ChPIcr | -0.9622 | -0.7383 | 0.4950 | 0.7545 | 0.9315 | -0.7949 | -0.7949 |
| baba | -0.9449 | -0.6982 | 0.4440 | 0.7154 | 0.9510 | -0.7586 | -0.7586 |
| 2.ª linha | | | | | | | |
| | LogIBP | LogIBaf | LogIBTMA | %Psy | %Staph | %Exiguo | %Alcag |
| LogIBP | 1.0000 | | | | | | |
| LogIBaf | 0.9934 | 1.0000 | | | | | |
| LogIBTMA | 0.9977 | 0.9834 | 1.0000 | | | | |
| %Psy | -0.9648 | -0.9886 | -0.9449 | 1.0000 | | | |
| %Staph | -0.9648 | -0.9886 | -0.9449 | 1.0000 | 1.0000 | | |
| %Exiguo | 0.9648 | 0.9886 | 0.9449 | -1.0000 | -1.0000 | 1.0000 | |
| %Alcag | 0.9648 | 0.9886 | 0.9449 | -1.0000 | -1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| %Stentp | 0.9648 | 0.9886 | 0.9449 | -1.0000 | -1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| pH | -0.9648 | -0.9886 | -0.9449 | 1.0000 | 1.0000 | -1.0000 | -1.0000 |
| aaimgN | 0.3351 | 0.2247 | 0.3977 | -0.0755 | -0.0755 | 0.0755 | 0.0755 |
| ChQIcz | 0.0863 | -0.0288 | 0.1531 | 0.1788 | 0.1788 | -0.1788 | -0.1788 |
| ChFerIcz | -0.7642 | -0.8332 | -0.7191 | 0.9069 | 0.9069 | -0.9069 | -0.9069 |
| ChPIcz | -0.7968 | -0.8609 | -0.7543 | 0.9277 | 0.9277 | -0.9277 | -0.9277 |
| ChFerIcr | -0.7214 | -0.6370 | -0.7663 | 0.5138 | 0.5138 | -0.5138 | -0.5138 |
| ChPIcr | -0.9265 | -0.8771 | -0.9497 | 0.7949 | 0.7949 | -0.7949 | -0.7949 |
| baba | -0.9033 | -0.8480 | -0.9301 | 0.7586 | 0.7586 | -0.7586 | -0.7586 |
| 3.ª linha | | | | | | | |
| | %Stentp | pH | aaimgN | ChQIcz | ChFerIcz | ChPIcz | ChFerIcr |
| %Stentp | 1.0000 | | | | | | |
| pH | -1.0000 | 1.0000 | | | | | |
| aaimgN | 0.0755 | -0.0755 | 1.0000 | | | | |
| ChQIcz | -0.1788 | 0.1788 | 0.9676 | 1.0000 | | | |
| ChFerIcz | -0.9069 | 0.9069 | 0.3516 | 0.5767 | 1.0000 | | |
| ChPIcz | -0.9277 | 0.9277 | 0.3023 | 0.5333 | 0.9986 | 1.0000 | |
| ChFerIcr | -0.5138 | 0.5138 | -0.8942 | -0.7522 | 0.1046 | 0.1563 | 1.0000 |
| ChPIcr | -0.7949 | 0.7949 | -0.6650 | -0.4548 | 0.4653 | 0.5109 | 0.9290 |
| baba | -0.7586 | 0.7586 | -0.7070 | -0.5054 | 0.4135 | 0.4604 | 0.9488 |
| 4.ª linha | | | | | | | |
| | ChPIcr | baba | | | | | |
| ChPIcr | 1.0000 | | | | | | |
| baba | 0.9983 | 1.0000 | | | | | |

3- Estudo da comparação do bacalhau de cura branca com o bacalhau de cura amarela

| | %H | %C1 | ABVT_mgN | TMA_mgN | Log_AT | Log_BLA | Log_BH2S |
|----------------------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| %H | 1.0000 | | | | | | |
| %C1 | -0.9945 | 1.0000 | | | | | |
| ABVT_mgN | 0.9942 | -1.0000 | 1.0000 | | | | |
| TMA_mgN | 0.6764 | -0.7498 | 0.7519 | 1.0000 | | | |
| Log_AT | 0.9537 | -0.9169 | 0.9157 | 0.4235 | 1.0000 | | |
| Log_BLA | -0.9852 | 0.9618 | -0.9609 | -0.5400 | -0.9912 | 1.0000 | |
| Log_BH2S | -0.6762 | 0.5953 | -0.5928 | 0.0852 | -0.8665 | 0.7926 | 1.0000 |
| Log_BH | 0.8351 | -0.7728 | 0.7708 | 0.1596 | 0.9619 | -0.9171 | -0.9700 |
| Ensaio2_notebook.txt | | | | | | | |
| Log_BP | 0.7577 | -0.8219 | 0.8237 | 0.9932 | 0.5264 | -0.6345 | -0.0316 |
| Log_Baf | 0.9946 | -1.0000 | 1.0000 | 0.7492 | 0.9173 | -0.9620 | -0.5960 |
| Log_BTMA | 0.9978 | -0.9992 | 0.9991 | 0.7236 | 0.9317 | -0.9717 | -0.6261 |
| %Psy | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| %Shew | -0.9267 | 0.9610 | -0.9619 | -0.9035 | -0.7709 | 0.8486 | 0.3500 |
| %Staph | 0.0049 | -0.1097 | 0.1128 | 0.7399 | -0.2961 | 0.1667 | 0.7334 |
| %Kok | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| %Alcag | -0.9267 | 0.9610 | -0.9619 | -0.9035 | -0.7709 | 0.8486 | 0.3500 |
| %Stentp | -0.4512 | 0.3552 | -0.3522 | 0.3522 | -0.6987 | 0.5976 | 0.9625 |
| P%Marc | -0.6082 | 0.5216 | -0.5189 | 0.1734 | -0.8187 | 0.7353 | 0.9960 |
| P%Salim | 0.9386 | -0.8973 | 0.8959 | 0.3807 | 0.9989 | -0.9839 | -0.8889 |
| P%Staph | 0.9585 | -0.9831 | 0.9837 | 0.8583 | 0.8283 | -0.8953 | -0.4381 |
| P%Salini | -0.8996 | 0.8488 | -0.8472 | -0.2867 | -0.9893 | 0.9612 | 0.9301 |
| P%Chro | -0.8979 | 0.9391 | -0.9402 | -0.9315 | -0.7240 | 0.8091 | -0.9219 |
| P%Haloms | -0.4130 | 0.5062 | -0.5089 | -0.9502 | -0.1200 | 0.2506 | -0.3916 |
| P%Cobet | -0.9801 | 0.9955 | -0.9958 | -0.8092 | -0.8750 | 0.9315 | 0.5165 |
| P%Vib | -0.8041 | 0.8620 | -0.8636 | -0.9818 | -0.5881 | 0.6902 | 0.1058 |
| P%Psych | -0.6254 | 0.7038 | -0.7060 | -0.9977 | -0.3619 | 0.4823 | -0.1518 |
| P%Clotstd | 0.9890 | -0.9991 | 0.9992 | 0.7778 | 0.8988 | -0.9490 | -0.5599 |
| P%Bacil | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| P%Exiguo | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| P%Planc | 0.9890 | -0.9991 | 0.9992 | 0.7778 | 0.8988 | -0.9490 | -0.5599 |
| P%Burk | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| P%Parac | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| P%Pseu | 0.9890 | -0.9991 | 0.9992 | 0.7778 | 0.8988 | -0.9490 | -0.5599 |
| P%PhotB | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| P%Arthr | 0.9890 | -0.9991 | 0.9992 | 0.7778 | 0.8988 | -0.9490 | -0.5599 |
| P%Kok | 0.7887 | -0.7200 | 0.7178 | 0.0806 | 0.9371 | -0.8825 | -0.9862 |
| P%veill | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Oscill | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%AlkaB | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%vag | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Chrys | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Variov | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%PhyB | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%RhoBac | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Shew | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%OceaPh | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Pseud | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Desulf | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Orni | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| P%Diet | 0.1380 | -0.2411 | 0.2441 | 0.8229 | -0.1662 | 0.0339 | 0.6363 |
| aa_mgN | 0.9949 | -1.0000 | 1.0000 | 0.7472 | 0.9185 | -0.9629 | -0.5985 |
| %G | -0.9569 | 0.9212 | -0.9200 | -0.4333 | -0.9999 | 0.9925 | 0.8610 |
| %P | 0.9515 | -0.9785 | 0.9792 | 0.8701 | 0.8150 | -0.8847 | -0.4169 |
| %C | -0.9486 | 0.9765 | -0.9772 | -0.8747 | -0.8095 | 0.8802 | 0.4083 |
| Crm | 0.9963 | -0.9818 | 0.9812 | 0.6106 | 0.9760 | -0.9963 | -0.7370 |
| Hue | -0.5109 | 0.4180 | -0.4152 | 0.2876 | -0.7458 | 0.6508 | 0.9788 |
| ChQ | 0.9049 | -0.9445 | 0.9456 | 0.9255 | 0.7350 | -0.8185 | -0.2984 |
| Palh | 0.9410 | -0.9713 | 0.9720 | 0.8857 | 0.7957 | -0.8690 | -0.3870 |
| Amb | 0.9497 | -0.9773 | 0.9779 | 0.8730 | 0.8115 | -0.8819 | -0.4115 |
| Marf | -0.9333 | 0.9658 | -0.9666 | -0.8957 | -0.7822 | 0.8579 | 0.3667 |
| Bril | 0.9095 | -0.9480 | 0.9490 | 0.9214 | 0.7424 | -0.8247 | -0.3088 |
| Log_BH | 1.0000 | | | | | | |
| Log_BP | 0.2737 | 1.0000 | | | | | |
| Log_Baf | 0.7734 | 0.8214 | 1.0000 | | | | |
| Log_BTMA | 0.7969 | 0.7992 | 0.9993 | 1.0000 | | | |
| %Psy | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | | |
| %Shew | -0.5672 | -0.9474 | -0.9608 | -0.9496 | -0.5000 | 1.0000 | |
| %Staph | -0.5461 | 0.6563 | 0.1088 | 0.0710 | -0.6109 | -0.3802 | 1.0000 |
| %Kok | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| %Alcag | -0.5672 | -0.9474 | -0.9608 | -0.9496 | -0.5000 | 1.0000 | -0.3802 |
| %Stentp | -0.8677 | 0.2406 | -0.3560 | -0.3912 | -0.9045 | 0.0829 | 0.8902 |
| P%Marc | -0.9446 | 0.0573 | -0.5224 | -0.5543 | -0.9677 | 0.2654 | 0.7908 |
| P%Salim | 0.9736 | 0.4860 | 0.8977 | 0.9137 | 0.9524 | -0.7402 | -0.3405 |

| | | | | | | | |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| P%Staph | 0.6435 | 0.9123 | 0.9829 | 0.9752 | 0.5807 | -0.9954 | 0.2899 |
| P%Salini | -0.9915 | -0.3965 | -0.8493 | -0.8687 | -0.9780 | 0.6696 | 0.4324 |
| P%Chro | -0.5076 | -0.9676 | -0.9388 | -0.9250 | -0.4376 | 0.9975 | -0.4446 |
| P%Haloms | 0.1562 | -0.9073 | -0.5054 | -0.4723 | 0.2341 | 0.7249 | -0.9127 |
| P%Cobet | -0.7092 | -0.8722 | -0.9954 | -0.9911 | -0.6509 | 0.9829 | -0.2034 |
| P%Vib | -0.3444 | -0.9972 | -0.8615 | -0.8416 | -0.2687 | 0.9685 | -0.5984 |
| P%Psych | -0.0930 | -0.9831 | -0.7031 | -0.6757 | -0.0136 | 0.8728 | -0.7833 |
| P%Clstd | 0.7446 | 0.8458 | 0.9990 | 0.9966 | 0.6892 | -0.9721 | 0.1526 |
| P%Bacil | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| P%Exiguo | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| P%Planc | 0.7446 | 0.8458 | 0.9990 | 0.9966 | 0.6892 | -0.9721 | 0.1526 |
| P%Burk | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| P%Parac | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| P%Pseu | 0.7446 | 0.8458 | 0.9990 | 0.9966 | 0.6892 | -0.9721 | 0.1526 |
| P%PhotB | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| P%Arthr | 0.7446 | 0.8458 | 0.9990 | 0.9966 | 0.6892 | -0.9721 | 0.1526 |
| P%Kok | 0.9968 | 0.1964 | 0.7206 | 0.7463 | 1.0000 | -0.5000 | -0.6109 |
| P%Veill | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Oscill | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%AlkaB | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Vag | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Chrys | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Variov | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%PhyB | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%RhoBac | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Shew | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%OceaPh | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Pseud | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Desulf | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Orni | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| P%Diet | -0.4296 | 0.7510 | 0.2402 | 0.2032 | -0.5000 | -0.5000 | 0.9911 |
| aa_mgN | 0.7753 | 0.8196 | 1.0000 | 0.9994 | 0.7227 | -0.9599 | 0.1057 |
| %G | -0.9588 | -0.5355 | -0.9216 | -0.9356 | -0.9333 | 0.7777 | 0.2857 |
| %P | 0.6254 | 0.9217 | 0.9783 | 0.9698 | 0.5614 | -0.9974 | 0.3122 |
| %C | -0.6180 | -0.9253 | -0.9763 | -0.9674 | -0.5536 | 0.9980 | -0.3212 |
| Crn | 0.8792 | 0.6988 | 0.9820 | 0.9884 | 0.8386 | -0.8910 | -0.0811 |
| Hue | -0.8996 | 0.1739 | -0.4189 | -0.4530 | -0.9314 | 0.1506 | 0.8571 |
| ChQ | 0.5215 | 0.9634 | 0.9442 | 0.9311 | 0.4521 | -0.9985 | 0.4300 |
| Palh | 0.5996 | 0.9338 | 0.9711 | 0.9613 | 0.5341 | -0.9992 | 0.3430 |
| Amb | 0.6207 | 0.9240 | 0.9771 | 0.9683 | 0.5565 | -0.9978 | 0.3178 |
| Marf | -0.5819 | -0.9415 | -0.9656 | -0.9550 | -0.5155 | 0.9998 | -0.3635 |
| Bril | 0.5307 | 0.9604 | 0.9478 | 0.9350 | 0.4617 | -0.9990 | 0.4202 |

| | %Kok | %Alcag | %Stentp | P%Marc | P%Salim | P%Staph | P%Salini |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| %Kok | 1.0000 | | | | | | |
| %Alcag | -0.5000 | 1.0000 | | | | | |
| %Stentp | -0.9045 | 0.0829 | 1.0000 | | | | |
| P%Marc | -0.9677 | 0.2654 | 0.9828 | 1.0000 | | | |
| P%Salim | 0.9524 | -0.7402 | -0.7314 | -0.8447 | 1.0000 | | |
| P%Staph | 0.5807 | -0.9954 | -0.1779 | -0.3565 | 0.8012 | 1.0000 | |
| P%Salini | -0.9780 | 0.6696 | 0.7957 | 0.8938 | -0.9950 | -0.7376 | 1.0000 |
| P%Chro | -0.4376 | 0.9975 | 0.0123 | 0.1967 | -0.6909 | -0.9862 | 0.6155 |
| P%Haloms | 0.2341 | 0.7249 | -0.6264 | -0.4718 | -0.0734 | -0.6556 | -0.0263 |
| P%Cobet | -0.6509 | 0.9829 | 0.2649 | 0.4384 | -0.8514 | -0.9960 | 0.7949 |
| P%Vib | -0.2687 | 0.9685 | -0.1678 | 0.0171 | -0.5496 | -0.9402 | 0.4637 |
| P%Psych | -0.0136 | 0.8728 | -0.4142 | -0.2390 | -0.3178 | -0.8220 | 0.2218 |
| P%Clstd | 0.6892 | -0.9721 | -0.3143 | -0.4842 | 0.8773 | 0.9901 | -0.8251 |
| P%Bacil | 1.0000 | -0.5000 | -0.9045 | -0.9677 | 0.9524 | 0.5807 | -0.9780 |
| P%Exiguo | 1.0000 | -0.5000 | -0.9045 | -0.9677 | 0.9524 | 0.5807 | -0.9780 |
| P%Planc | 0.6892 | -0.9721 | -0.3143 | -0.4842 | 0.8773 | 0.9901 | -0.8251 |
| P%Burk | 1.0000 | -0.5000 | -0.9045 | -0.9677 | 0.9524 | 0.5807 | -0.9780 |
| P%Parac | 1.0000 | -0.5000 | -0.9045 | -0.9677 | 0.9524 | 0.5807 | -0.9780 |
| P%Pseu | 0.6892 | -0.9721 | -0.3143 | -0.4842 | 0.8773 | 0.9901 | -0.8251 |
| P%PhotB | 1.0000 | -0.5000 | -0.9045 | -0.9677 | 0.9524 | 0.5807 | -0.9780 |
| P%Arthr | 0.6892 | -0.9721 | -0.3143 | -0.4842 | 0.8773 | 0.9901 | -0.8251 |
| P%Kok | 1.0000 | -0.5000 | -0.9045 | -0.9677 | 0.9524 | 0.5807 | -0.9780 |
| P%Veill | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |

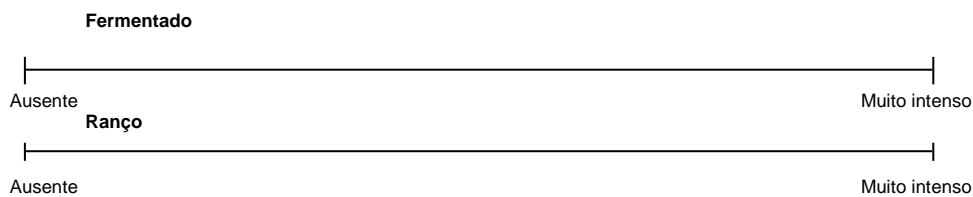
| | | | | | | | |
|----------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|---------|
| P%Oscill | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%AlkaB | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Vag | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Chrys | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Variov | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%PhyB | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%RhoBac | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Shew | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%OceaPh | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Pseud | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Desulf | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Orni | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| P%Diet | -0.5000 | -0.5000 | 0.8216 | 0.7023 | -0.2122 | 0.4148 | 0.3084 |
| aa_mgN | 0.7227 | -0.9599 | -0.3589 | -0.5250 | 0.8990 | 0.9823 | -0.8509 |
| %G | -0.9333 | 0.7777 | 0.6909 | 0.8125 | -0.9983 | -0.8343 | 0.9876 |
| %P | 0.5614 | -0.9974 | -0.1548 | -0.3345 | 0.7870 | 0.9997 | -0.7216 |
| %C | -0.5536 | 0.9980 | 0.1455 | 0.3256 | -0.7811 | -0.9995 | 0.7151 |
| Crm | 0.8386 | -0.8910 | -0.5262 | -0.6741 | 0.9648 | 0.9304 | -0.9338 |
| Hue | -0.9314 | 0.1506 | 0.9977 | 0.9931 | -0.7762 | -0.2446 | 0.8351 |
| ChQ | 0.4521 | -0.9985 | -0.0284 | -0.2125 | 0.7025 | 0.9887 | -0.6281 |
| Palh | 0.5341 | -0.9992 | -0.1225 | -0.3036 | 0.7664 | 0.9984 | -0.6987 |
| Amb | 0.5565 | -0.9978 | -0.1490 | -0.3289 | 0.7833 | 0.9996 | -0.7175 |
| Marf | -0.5155 | 0.9998 | 0.1007 | 0.2827 | -0.7522 | -0.9970 | 0.6828 |
| Bril | 0.4617 | -0.9990 | -0.0393 | -0.2231 | 0.7102 | 0.9903 | -0.6365 |
| | P%Chro | P%Haloms | P%Cobet | P%Vib | P%Psych | P%Clostd | P%Bacil |
| P%Chro | 1.0000 | | | | | | |
| P%Haloms | 0.7717 | 1.0000 | | | | | |
| P%Cobet | 0.9674 | 0.5857 | 1.0000 | | | | |
| P%Vib | 0.9837 | 0.8735 | 0.9061 | 1.0000 | | | |
| P%Psych | 0.9051 | 0.9689 | 0.7680 | 0.9668 | 1.0000 | | |
| P%Clostd | -0.9531 | -0.5431 | -0.9987 | -0.8831 | -0.7339 | 1.0000 | |
| P%Bacil | -0.4376 | 0.2341 | -0.6509 | -0.2687 | -0.0136 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Exiguo | -0.4376 | 0.2341 | -0.6509 | -0.2687 | -0.0136 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Planc | -0.9531 | -0.5431 | -0.9987 | -0.8831 | -0.7339 | 1.0000 | 0.6892 |
| P%Burk | -0.4376 | 0.2341 | -0.6509 | -0.2687 | -0.0136 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Parac | -0.4376 | 0.2341 | -0.6509 | -0.2687 | -0.0136 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Pseu | -0.9531 | -0.5431 | -0.9987 | -0.8831 | -0.7339 | 1.0000 | 0.6892 |
| P%PhotB | -0.4376 | 0.2341 | -0.6509 | -0.2687 | -0.0136 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Arthr | -0.9531 | -0.5431 | -0.9987 | -0.8831 | -0.7339 | 1.0000 | 0.6892 |
| P%Kok | -0.4376 | 0.2341 | -0.6509 | -0.2687 | -0.0136 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Veill | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Oscill | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%AlkaB | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Vag | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Chrys | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Variov | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%PhyB | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%RhoBac | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Shew | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%OceaPh | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Pseud | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Desulf | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Orni | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| P%Diet | -0.5599 | -0.9590 | -0.3320 | -0.6998 | -0.8591 | 0.2829 | -0.5000 |
| aa_mgN | -0.9377 | -0.5027 | -0.9951 | -0.8599 | -0.7009 | 0.9989 | 0.7227 |
| %G | 0.7314 | 0.1307 | 0.8802 | 0.5968 | 0.3719 | -0.9035 | -0.9333 |
| %P | -0.9898 | -0.6731 | -0.9937 | -0.9480 | -0.8351 | 0.9865 | 0.5614 |
| %C | 0.9911 | 0.6800 | 0.9926 | 0.9509 | 0.8403 | -0.9849 | -0.5536 |
| Crm | -0.8568 | -0.3332 | -0.9594 | -0.7500 | -0.5561 | 0.9727 | 0.8386 |
| Hue | 0.0804 | -0.5719 | 0.3300 | -0.1002 | -0.3512 | -0.3783 | -0.9314 |
| ChQ | -0.9999 | -0.7613 | -0.9714 | -0.9807 | -0.8981 | 0.9579 | 0.4521 |
| Palh | -0.9939 | -0.6968 | -0.9895 | -0.9578 | -0.8526 | 0.9807 | 0.5341 |
| Amb | -0.9906 | -0.6775 | -0.9930 | -0.9498 | -0.8384 | 0.9855 | 0.5565 |
| Marf | 0.9961 | 0.7124 | 0.9860 | 0.9639 | 0.8639 | -0.9761 | -0.5155 |
| Bril | -0.9996 | -0.7542 | -0.9739 | -0.9785 | -0.8932 | 0.9609 | 0.4617 |

| | P%EXIGUO | P%PLANC | P%BURK | P%PARAC | P%PSEU | P%PHOUB | P%ARLUC |
|----------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|
| P%Exiguo | 1.0000 | | | | | | |
| P%Planc | 0.6892 | 1.0000 | | | | | |
| P%Burk | 1.0000 | 0.6892 | 1.0000 | | | | |
| P%Parac | 1.0000 | 0.6892 | 1.0000 | 1.0000 | | | |
| P%Pseu | 0.6892 | 1.0000 | 0.6892 | 0.6892 | 1.0000 | | |
| P%PhotB | 1.0000 | 0.6892 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | |
| P%Arthr | 0.6892 | 1.0000 | 0.6892 | 0.6892 | 1.0000 | 0.6892 | 1.0000 |
| P%Kok | 1.0000 | 0.6892 | 1.0000 | 1.0000 | 0.6892 | 1.0000 | 0.6892 |
| P%Veill | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Oscill | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%AlkaB | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Vag | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Chrys | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Variov | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%PhyB | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%RhoBac | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Shew | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%OceaPh | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Pseud | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Desulf | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Orni | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| P%Diet | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | -0.5000 | 0.2829 | -0.5000 | 0.2829 |
| aa_mgN | 0.7227 | 0.9989 | 0.7227 | 0.7227 | 0.9989 | 0.7227 | 0.9989 |
| %G | -0.9333 | -0.9035 | -0.9333 | -0.9333 | -0.9035 | -0.9333 | -0.9035 |
| %P | 0.5614 | 0.9865 | 0.5614 | 0.5614 | 0.9865 | 0.5614 | 0.9865 |
| %C | -0.5536 | -0.9849 | -0.5536 | -0.5536 | -0.9849 | -0.5536 | -0.9849 |
| CrM | 0.8386 | 0.9727 | 0.8386 | 0.8386 | 0.9727 | 0.8386 | 0.9727 |
| Hue | -0.9314 | -0.3783 | -0.9314 | -0.9314 | -0.3783 | -0.9314 | -0.3783 |
| ChQ | 0.4521 | 0.9579 | 0.4521 | 0.4521 | 0.9579 | 0.4521 | 0.9579 |
| Palh | 0.5341 | 0.9807 | 0.5341 | 0.5341 | 0.9807 | 0.5341 | 0.9807 |
| Amb | 0.5565 | 0.9855 | 0.5565 | 0.5565 | 0.9855 | 0.5565 | 0.9855 |
| Marf | -0.5155 | -0.9761 | -0.5155 | -0.5155 | -0.9761 | -0.5155 | -0.9761 |
| Bril | 0.4617 | 0.9609 | 0.4617 | 0.4617 | 0.9609 | 0.4617 | 0.9609 |
| | P%Kok | P%Veill | P%Oscill | P%AlkaB | P%Vag | P%Chrys | P%Variov |
| P%Kok | 1.0000 | | | | | | |
| P%Veill | -0.5000 | 1.0000 | | | | | |
| P%Oscill | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | | | | |
| P%AlkaB | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | | | |
| P%Vag | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | | |
| P%Chrys | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | |
| P%Variov | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%PhyB | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%RhoBac | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%Shew | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%OceaPh | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%Pseud | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%Desulf | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%Orni | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%Diet | -0.5000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| aa_mgN | 0.7227 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 |
| %G | -0.9333 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 |
| %P | 0.5614 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 |
| %C | -0.5536 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 |
| CrM | 0.8386 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 |
| Hue | -0.9314 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 |
| ChQ | 0.4521 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 |
| Palh | 0.5341 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 |
| Amb | 0.5565 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 |
| Marf | -0.5155 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 |
| Bril | 0.4617 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 |
| | P%PhyB | P%RhoBac | P%Shew | P%OceaPh | P%Pseud | P%Desulf | P%Orni |
| P%RhoBac | 1.0000 | 1.0000 | | | | | |
| P%Shew | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | | | | |
| P%OceaPh | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | | | |
| P%Pseud | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | | |
| P%Desulf | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | |
| P%Orni | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| P%Diet | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| aa_mgN | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 | 0.2372 |
| %G | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 | 0.1555 |
| %P | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 | 0.4360 |
| %C | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 | -0.4444 |
| CrM | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 | 0.0524 |
| Hue | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 | 0.7809 |
| ChQ | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 | 0.5464 |
| Palh | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 | 0.4651 |
| Amb | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 | 0.4413 |
| Marf | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 | -0.4844 |
| Bril | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 | 0.5373 |
| | P%Diet | aa_mgN | %G | %P | %C | CrM | Hue |
| P%Diet | 1.0000 | | | | | | |
| aa_mgN | 0.2372 | 1.0000 | | | | | |
| %G | 0.1555 | -0.9227 | 1.0000 | | | | |
| %P | 0.4360 | 0.9777 | -0.8212 | 1.0000 | | | |
| %C | -0.4444 | -0.9757 | 0.8158 | -1.0000 | 1.0000 | | |
| CrM | 0.0524 | 0.9826 | -0.9783 | 0.9216 | -0.9179 | 1.0000 | |
| Hue | 0.7809 | -0.4217 | 0.7386 | -0.2218 | 0.2126 | -0.5829 | 1.0000 |
| ChQ | 0.5464 | 0.9432 | -0.7423 | 0.9919 | -0.9931 | 0.8650 | -0.0965 |
| Palh | 0.4651 | 0.9703 | -0.8022 | 0.9995 | -0.9997 | 0.9084 | -0.1899 |
| Amb | 0.4413 | 0.9764 | -0.8178 | 1.0000 | -1.0000 | 0.9193 | -0.2160 |
| Marf | -0.4844 | -0.9648 | 0.7889 | -0.9985 | 0.9990 | -0.8990 | 0.1683 |
| Bril | 0.5373 | 0.9468 | -0.7496 | 0.9933 | -0.9943 | 0.8704 | -0.1073 |
| | ChQ | Palh | Amb | Marf | Bril | | |
| ChQ | 1.0000 | | | | | | |
| Palh | 0.9955 | 1.0000 | | | | | |
| Amb | 0.9927 | 0.9996 | 1.0000 | | | | |
| Marf | -0.9974 | -0.9998 | -0.9988 | 1.0000 | | | |
| Bril | 0.9999 | 0.9965 | -0.9939 | -0.9981 | 1.0000 | | |

ANEXO VI

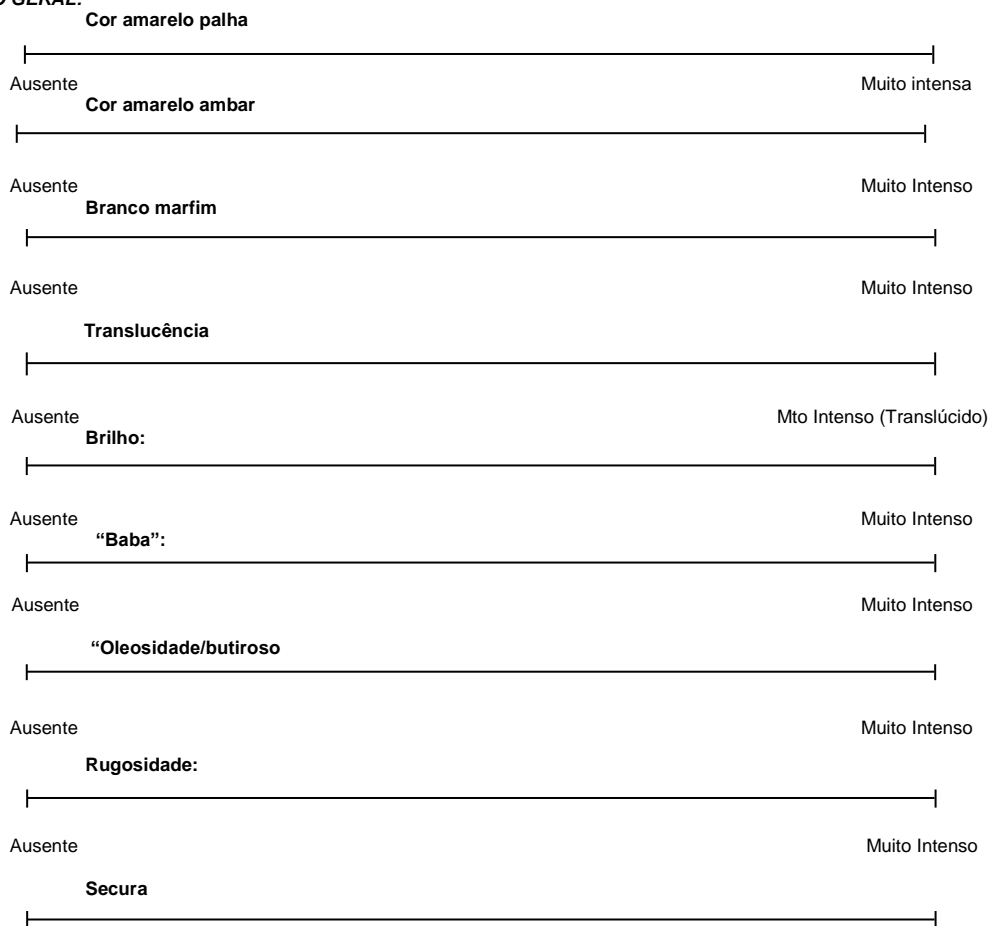
FOLHA DE PROVA Avaliação Sensorial – Bacalhau cozido

| | | | |
|---|---|-----------------------------|--|
| NOME: | | DATA: | |
| CHEIRO: | | | |
| | Característico | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | A queijo | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | A fermentado | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | A batata | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | A ranço | | |
| | _____ | | |
| COR: | | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | Amarelo palha | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intensa | |
| | Creme/branco sujo/ "cor champagne" | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito Intenso | |
| | Marfim | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito Intenso | |
| ASPECTO: | | | |
| | Melado | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito Intenso | |
| | Formação de Lascas | | |
| | _____ | | |
| 0 (Não forma (lascas perfeitas) | | Muito Intenso | |
| TEXTURA | | | |
| | Firmeza | | |
| | _____ | | |
| Ausente (mole) | | Muito Intenso (firme) | |
| | Elasticidade | | |
| | _____ | | |
| Ausente (pastoso/adere ao palato/dentes) | | Muito Intenso (elástico) | |
| | Fibrosidade | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | Untuosidade | | |
| | _____ | | |
| SABOR: | | | |
| Ausente | | Muito intenso | |
| | Característico | | |
| | _____ | | |
| Ausente | | Muito intenso | |



Avaliação Sensorial – Bacalhau cru

ASPECTO GERAL:



CHEIRO:



ANEXO VII

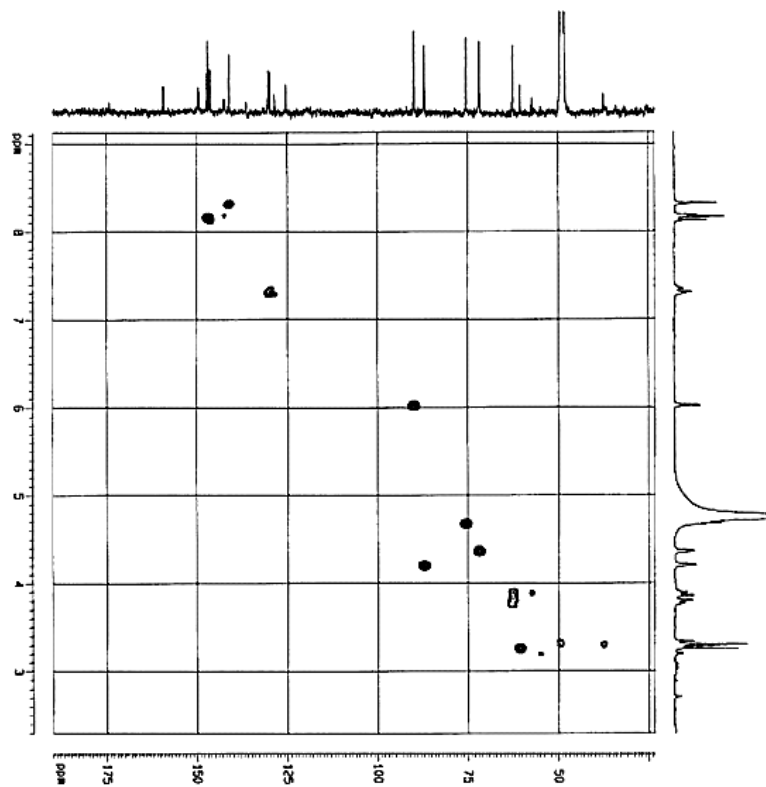


Figura 1 – Espectro total de análise HMQC (do pigmento) da amostra LB5a.

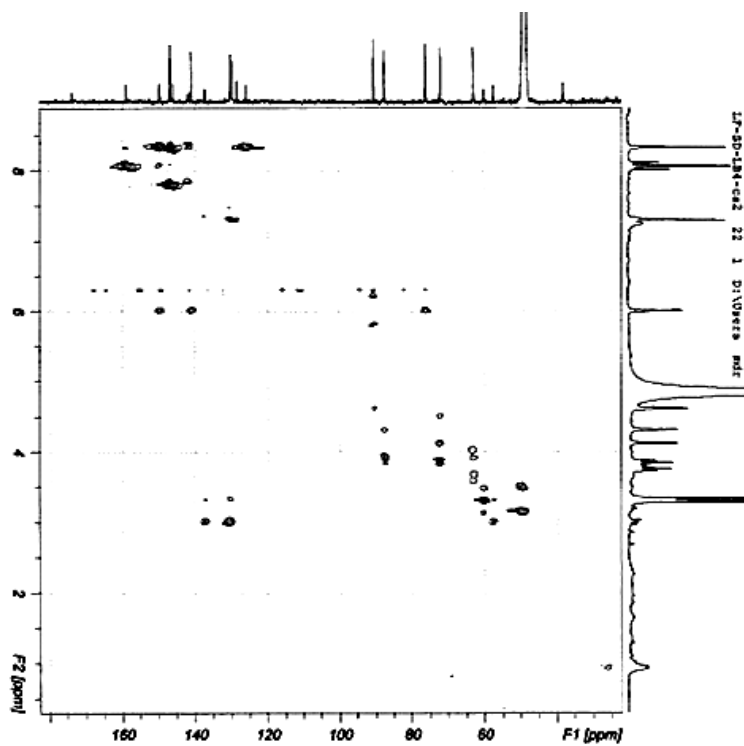


Figura 2 - Espectro de análise HMBC (do pigmento) da amostra LB4a.

