



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*
TRATADO COM INIBIDORES DE MELANOSE E ESTOCADO EM GELO**

IANNA WIVIANNE FERNANDES DE ARAÚJO

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

ABRIL/2007

Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*
TRATADO COM INIBIDORES DE MELANOSE E ESTOCADO EM GELO**

**Orientador: Prof. Dr. Masayoshi Ogawa
Departamento de Engenharia de Pesca**

**Co-orientadora: M.Sc. Norma Barreto Perdigão Ogawa
Química Industrial – Pesquisadora**

**Dissertação de mestrado
submetida à coordenação do
Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Pesca da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre em
Engenharia de Pesca.**

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

ABRIL/2007

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciência e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Prof. Dr. Masayoshi Ogawa
Orientador

Prof. Dr. Everardo Lima Maia
Examinador

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Nunes
Examinadora

*À Deus,
Aos meus pais Lêda e Inácio,
Ao meu namorado Rafael,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que concluísse com êxito esse trabalho e por propiciar-me forças para vencer todos os obstáculos que surgiram durante minha vida.

Aos meus pais, pela dedicação durante a formação do meu caráter e o esforço no meu desenvolvimento intelectual, sem eles não teria alcançado tantos objetivos almejados.

Ao Prof. Dr. Masayoshi Ogawa, pela orientação, incentivo, credibilidade e os ensinamentos tão valiosos durante minha vida acadêmica, que sem sua ajuda não seria possível à realização desse trabalho.

À pesquisadora Norma Barreto Perdigão Ogawa, pela co-orientação, incentivo, sem esquecer a valiosa colaboração na escrita desse trabalho e, principalmente, por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Everardo Lima Maia, por seu profissionalismo, participação na banca examinadora e pela dedicação de seu valioso tempo durante às correções da minha dissertação.

À Prof^a. Maria Lúcia Nunes, pelas dicas, correções, por sua colaboração durante a execução do projeto de pesquisa, amizade e participação na banca examinadora.

Ao meu namorado Rafael Alencar, pelo amor, dedicação, paciência, incentivo e confiança desde o primeiro momento que nos conhecemos. Agradeço a Deus, por você está fazendo parte de muitas conquistas importantes durante minha caminhada.

À minha querida amiga Ana Irene Martins, por sua amizade, ajuda na vida acadêmica, pelos conselhos e pela valiosa contribuição nas análises microbiológicas que foram fundamentais na conclusão desse trabalho.

Às minhas amigas Francisca Lílian, Neuma Basílio e Cláudia Cinthia, pela amizade, valiosa colaboração na realização das análises físico-químicas, imprescindíveis no término da minha dissertação e pelos momentos de alegria durante nosso tempo de trabalho no laboratório.

Aos meus amigos Neto, Hedilberto, Diego Wesley, Luis Paulo e Oscar Pacheco, pela valiosa ajuda durante a execução desse trabalho e amizade.

Aos amigos Robson Cabral, André Prata e Janaína Araújo, pelo apoio e ajuda durante o período do curso de mestrado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, por fornecer ajudar financeira através de bolsa de mestrado, de alta importância no decorrer do curso.

Aos Engenheiros de Pesca Mosart e Jucimar, pela concessão dos camarões *Litopenaeus vannamei*, sem os quais não seria possível iniciar o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao Dr. Marcelo Miranda, pela colaboração na finalização desse trabalho escrito.

Aos meus colegas do Laboratório de Recursos Aquáticos – Laraq, pelo apoio durante o período de mestrado e também todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização da minha dissertação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	01
REFERENCIALTEÓRICO.....	07
1. Histórico da carcinicultura.....	07
2. Controle de qualidade do pescado.....	08
2.1. Características gerais do pescado.....	08
3. Análise sensorial do pescado.....	09
4. Melanose em crustáceos.....	11
4.1. Surgimento da melanose.....	11
4.2. Prevenção da melanose.....	13
4.2.1. Uso de sulfitos e ácido ascórbico.....	13
5. Reações bioquímicas após a morte do pescado.....	15
5.1. O estado de frescor.....	17
5.2. Trimetilamina (TMA).....	19
5.3. Bases Voláteis Totais (BVT).....	22
5.4. Acompanhamento do pH.....	24
6. Deterioração bacteriana.....	25
6.1. Bactérias deteriorantes.....	25
6.2. Bactérias patogênicas.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28

1. Matéria prima.....	28
2. Metodologia.....	28
2.1. Uso do ácido ascórbico polietoxilato como conservante e inibidor de melanose.....	28
3. Observação dos caracteres sensoriais.....	30
3.1. Análises sensoriais.....	30
3.1.1. Análises objetivas.....	30
3.1.2. Análises subjetivas.....	31
4. Análises físico-químicas.....	32
4.1. Determinação do valor de K.....	32
4.2. Quantificação da trimetilamina.....	32
4.3. Quantificação das bases voláteis totais.....	32
4.4. Acompanhamento do pH.....	33
5. Análises Microbiológicas.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
1. Alteração na qualidade do camarão estocado em gelo.....	34
1.1. Análise sensorial.....	34
1.2. Análise sensorial objetiva e subjetiva entre os tratamentos com ácido ascórbico.....	35
1.3. Análise sensorial objetiva e subjetiva entre os tratamentos com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio.....	38
2. Análises físico-químicas.....	43
2.1. Valor de K.....	44
2.2. Trimetilamina (TMA) e Bases voláteis totais (BVT).....	45
2.3. pH.....	47

3. Análises microbiológicas.....	51
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	63

RESUMO

A qualidade do pescado é um tópico de grande interesse dos produtores do setor pesqueiro, tendo em vista o aumento nos mercados internacionais para produtos frescos de pescado. Esse trabalho teve como objetivo comparar a eficiência do ácido ascórbico e do metabissulfito de sódio sobre o tempo de conservação e inibição de melanose de camarões acondicionados em gelo. Foram adquiridos camarões vivos da espécie *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do Estado do Ceará. Imediatamente após a despesca, os camarões foram imersos em soluções de quatro diferentes concentrações de ácido ascórbico a 200, 300, 400 e 500 ppm e de metabissulfito de sódio a 6%. Posteriormente, os crustáceos submetidos aos diferentes tratamentos foram estocados em gelo por vinte dias. A cada 48 horas foram retiradas amostras para avaliação do grau de melanose, dos caracteres sensoriais, análises microbiológicas, determinação da trimetilamina (TMA), das bases voláteis totais (BVT), do valor de K e o acompanhamento do pH. Os tratamentos com ácido ascórbico mostraram serem úteis no controle da melanose. No entanto, o tratamento com metabissulfito de sódio foi mais eficiente na prevenção da melanose. Quanto à avaliação do quesito controle de qualidade do camarão armazenado em gelo, não houve diferença entre os tratamentos. Foi verificado que a partir do 14º dia os camarões estocados em gelo mostraram sinais de putrefação. Conclui-se que não é viável economicamente a utilização do ácido ascórbico no controle da melanose em camarões, visto que poderia haver necessidade de concentrações mais elevadas do produto nos tratamentos de imersão para evitar o surgimento de manchas pretas.

Palavras chave: *Litopenaeus vannamei*, melanose, controle de qualidade.

ABSTRACT

Quality of fisheries products is a subject of great interest among producers since the international market for fresh products is expanding. The objective of the present study was to compare the efficiency of ascorbic acid and sodium metabisulfite in conserving product quality for long periods and inhibiting black spot occurrence in shrimp kept in ice. Live shrimp, *Litopenaeus vannamei*, grown in a shrimp farm at Ceara State, Brazil, were used in the experiment. Immediately after capture, the shrimp were immersed in four different concentrations of ascorbic acid (200, 300, 400 and 500 ppm) and also in 6% sodium metabisulfite. After that, all the shrimp from the five treatments were transferred to ice and kept for 20 days. Every 48 hours samples from the five treatments were taken in order to analyze the level of black spot occurrence, sensorial characteristics, trimethylamine, total volatile basic, K value and pH value. The ascorbic acid showed good results in preventing black spot, although sodium metabisulfite was more efficient in preventing it. When quality control was evaluated from shrimp kept in ice, no significant different was observed among the treatments. After 16 days kept in ice, all shrimp showed some level of decay. Although the ascorbic acid showed good results in preventing black spot occurrence, it is not economically viable to use it for shrimp, since the product is costly and requires high concentration to prevent black spot.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, black spot, quality control.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Representação dos parâmetros avaliados na análise sensorial.....	35
FIGURA 2 - Representação dos parâmetros avaliados na análise sensorial.....	38
FIGURA 3 - Tratamento (TM) após 24 horas de estocagem em gelo....	39
FIGURA 4 - Tratamento (TM) após 6 dias de estocagem em gelo.....	40
FIGURA 5 – Representação gradual do surgimento da melanose no TM e TAI durante estocagem em gelo.....	42
FIGURA 6 - Valores dos níveis de valor de K em camarões estocados em gelo.....	49
FIGURA 7 - Valores dos níveis de TMA em camarões estocados em gelo.....	50
FIGURA 8 - Valores dos níveis de BVT em camarões estocados em gelo.....	50
FIGURA 9 - Valores dos níveis de pH em camarões estocados em gelo.....	51
FIGURA 10 - Representação logarítmica das contagens de bactérias mesófilas presentes nos camarões estocados em gelo.....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Escala numérica para acompanhar as alterações nas características físicas dos camarões após tratamento com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, seguida de estocagem em gelo..	31
TABELA 2 - Análise sensorial do camarão <i>L. vannamei</i> durante estocagem em gelo.....	34
TABELA 3 - Valores médios de TMA, BVT, valor de K e pH em camarões estocados em gelo.....	43

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1 - Tabela: Valores das análises microbiológicas na estocagem em gelo.....	64
ANEXO 2 – Valor de K	65
ANEXO 3 – Método de Dyer - TMA.....	68
ANEXO 4 – Bases voláteis totais - BVT	72
ANEXO 5 – Análises microbiológicas.....	74

INTRODUÇÃO

A espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), também conhecida como “camarão cinza” ou “camarão branco do Pacífico”, constitui importante recurso que está sendo cultivado e exportado pelos Estados do Nordeste brasileiro, sobretudo pelo Ceará. Atualmente é encontrado em quase todos os Estados litorâneos do país (ABCC, 2006).

É uma espécie originária da Costa Ocidental do Oceano Pacífico, mais precisamente da Província de Sonora no México até o sul de Tumbes no Norte do Peru (BRIGGS et al., 2004). É considerada uma espécie exótica ao litoral brasileiro e foi introduzida no Brasil na década de 80, sendo responsável pelo desenvolvimento da carcinicultura nacional. (BRASIL/CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2002).

A carcinicultura brasileira teve no início da década um surpreendente crescimento econômico até o ano de 2003, constituindo-se numa das atividades mais rentáveis do agronegócio nordestino (MADRID, 2005).

Dados recentes informam que as exportações de camarão inteiro foram da ordem de U\$ 124 milhões, com um volume de 30 mil toneladas, equivalente a U\$ 4,12/kg, no ano de 2006. Tendo como principais exportadores os estados do Ceará e Rio Grande do Norte, respondendo juntos por 75% do volume das exportações deste produto (BRASIL, 2007).

Da produção de camarão cultivado em 2003, um percentual de 77,7% se destina ao mercado externo com produtos de pouquíssimo valor agregado. Do total exportado, 35% foram enviados aos Estados Unidos (camarão sem cabeça) e 62% aos países europeus (camarão inteiro) (WURMANN e MADRID, 2006).

A determinação da qualidade do pescado é um tópico de grande interesse dos produtores do setor pesqueiro, tendo em vista o aumento nos mercados internacionais para produtos frescos de pescado e o crescimento da indústria baseada na aquicultura. Uma maior quantidade de pescado está sendo transportada para longas distâncias e a avaliação do frescor é requerida para permitir um prognóstico de qualidade ao comprador final.

A avaliação das alterações sensoriais como mudança de coloração na cabeça (vermelha e preta), afrouxamento da cabeça, melanose e outros defeitos na cauda e alterações no odor dos camarões inteiros são exigidas pelas normas de controle de qualidade da indústria para exportação do pescado. Por se tratar de um produto altamente perecível, quando no seu estado fresco, é exigido pelas indústrias um controle rigoroso e sistemático de parâmetros que possam monitorar a qualidade do camarão.

A melanose severa nestes crustáceos pode causar grandes perdas econômicas devido ao considerável valor destes produtos nos mercados. Há muitos exemplos de exportações de crustáceos que entram nos países importadores avaliados em milhões de dólares cujos valores são reduzidos ou perdidos completamente devido à severidade desse fenômeno.

O controle imediato é o do surgimento da melanose que pode ocorrer logo após a despesca, ao longo da estocagem em gelo ou sob congelamento, constituindo sério agravante para os países que exploram tais recursos, dadas as grandes perdas de divisas (OGAWA e DINIZ, 1999).

Segundo Hodgson et al. (2004), alguns compradores europeus de camarão inteiro fazem uma simulação das condições nos seus mercados de frutos do mar, retirando um bloco de camarão congelado da sua embalagem e deixando-o em temperatura ambiente por quatro horas. Se a cabeça ficar preta ou afrouxar, o produto é rejeitado.

No processo de despesca os camarões são mergulhados numa solução de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) contendo gelo para evitar a formação de melanose (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Visando inibir a formação de melanose, a FDA (Food and Drug Administration - EUA) recomenda o tratamento de imersão por 10 minutos dos camarões em solução de metabissulfito de sódio a 1%. No entanto, para o tratamento de camarões despescados de viveiros, esta recomendação não é suficiente para inibir de forma satisfatória o aparecimento de manchas pretas. Na prática, os parâmetros concentração e tempo de imersão vêm sendo estabelecidos pelo produtor e junto a isto, um constante monitoramento dos níveis de SO_2 residual para que não excedam o limite imposto pelos importadores que é de 100ppm podendo atingir até 150ppm dependendo do país importador.

O metabissulfito de sódio se usado em excesso pode ser considerado uma substância nociva à saúde humana por suas propriedades alérgicas. A utilização de produtos formulados a partir de ácido ascórbico poderia ser uma

opção para evitar a formação de manchas pretas e contribuir com a conservação e o grau de frescor dos crustáceos por mais tempo.

Segundo Bailey et al. (1960) substâncias redutoras como ácido ascórbico são usados no controle de manchas pretas em camarão visto que reduzem imediatamente orto-quinonas e retardam a formação de melanina.

Marcos e Maqueda (2003) salientam que o ácido ascórbico, seus inúmeros sais neutros e outros derivados têm sido considerados como os antioxidantes mais inócuos para se utilizar como aditivos na prevenção da melanose e outras reações oxidativas.

Nos camarões *L. vannamei* observa-se o surgimento de coloração avermelhada no cefalotórax logo nos primeiros dias de estocagem em gelo, provavelmente devido ao desligamento dos pigmentos carotenóides das proteínas, liberando o pigmento de coloração vermelho-alaranjado. A ocorrência de “cabeça vermelha” tem implicações na qualidade sensorial do camarão o que obriga a indústria a efetuar o seu descabeçamento, gerando perda para os produtores.

A cabeça vermelha nos camarões, após a despesca, ocorre devido à quebra da ligação caroteno-proteína (carotenóide + proteína) ocasionada pela desnaturação da proteína, conferindo a coloração natural do carotenóide. Esta reação é característica de situações nas quais os camarões foram expostos a altas temperaturas por tempo prolongado, como em despescas com pouco gelo, sob sol forte e demora no envio dos camarões para a indústria (CARVALHO et al., 2005).

A associação dos carotenóides com proteínas estabiliza o pigmento e também muda sua cor (FENNEMA, 1985). A quebra do complexo libera o pigmento astaxantina com sua cor avermelhada natural.

A fim de se compreender melhor a incidência destes defeitos da aparência do camarão durante sua conservação é interessante conhecer a sua relação com o estado de frescor do camarão

Além dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, outros fatores básicos que podem auxiliar na avaliação da qualidade de um alimento estão associados aos atributos sensoriais.

Durante o acompanhamento do estado de frescor do pescado são observadas reações bioquímicas que ocorrem durante o *rigor-mortis*, influenciadas diretamente pelo modo de captura desses organismos (SIKORSKI, 1994).

A decomposição ou deterioração do pescado está ligada a um processo de alteração que se estabelece depois da morte do animal e que progride com o passar do tempo, tornando-se, finalmente, impróprio para o consumo humano (KIETZMANN et al., 1974).

As mudanças bioquímicas e microbiológicas que ocorrem nos tecidos do pescado após a morte, dependem significativamente dos fatores que afetam a concentração de substratos e metabólitos nos tecidos do pescado vivo, atividade das enzimas endógenas, contaminação microbiana e condições da captura (SIKORSKI, 1994).

Há um grande número de trabalhos sobre as mudanças bioquímicas que ocorrem após a morte do pescado, no entanto, pouca informação encontra-se disponível no que se refere ao camarão *L. vannamei*.

Esse trabalho teve como objetivo comparar a eficiência do ácido ascórbico polietoxilato comercial e do metabissulfito de sódio sobre o tempo de conservação e inibição de melanose de camarões acondicionados em gelo.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Histórico da carcinicultura

A carcinicultura marinha brasileira sofreu um grande impulso com a introdução do *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) a partir do final da década de 80 (PONTES e ARRUDA, 2005).

O camarão marinho cultivado vem se destacando, nos últimos anos, como um dos principais responsáveis pelo superávit da balança comercial do pescado brasileiro (GÓES et al., 2006).

Rocha (2004) afirma que o valor alcançado com as exportações desse agronegócio, no período de janeiro a novembro de 2003, foi de US\$ 210,47 milhões e, portanto, mais da metade de toda a exportação do setor de pescado do Brasil.

Reporta Rodrigues (apud GÓES et al., 2006) que apesar da atividade ter sido altamente crescente, a partir de 1996, a produção de 2004 foi de apenas 75.904 toneladas, o que representou uma queda de 15,8% em relação a 2003.

Segundo Góes et al. (2006), o escoamento do camarão cultivado do Brasil em 2004 foi realizado principalmente para a América do Norte (23,09%) e a Europa (75,61%). Entre os países da comunidade europeia destacam-se a França, Espanha, Itália, Alemanha, Portugal e a Bélgica, pelo volume de

compra e rigidez no tocante às exigências da qualidade, em especial da carga microbiana existente no camarão.

2. Controle de qualidade do pescado

2.1. Características gerais do pescado

De acordo com Sacconi (1988), os pescados são produtos que se alteram rapidamente à temperatura ambiente ou no estado refrigerado e que comumente são capturados longe dos centros de consumo, por isso, o congelamento dos mesmos apresenta grande importância comercial.

O pescado é uma das principais fontes de proteína do ser humano. É também um dos alimentos mais suscetíveis à deterioração devido à atividade de água elevada, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo a neutralidade (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Também Tavares et al. (1988), reporta que o pescado deve estar íntegro e não apresentar cheiro ou sabor anormal, lesões ou doenças microbianas. O camarão fresco deve possuir as seguintes características: corpo curvo, carapaça transparente e aderente ao corpo, que não deixe escapar facilmente os pereópodos, os pleópodos e o cefalotórax da cauda. Deve ainda apresentar ausência de qualquer pigmentação rósea, músculos consistentes e olhos negros bem destacados.

De acordo com Silva et al. (2003), há a obrigatoriedade de beneficiar camarões congelados isentos de contaminações microbiológicas, com o intuito de evitar prejuízos ao consumidor. Além disso, enfatizaram também que, do ponto de vista econômico, contaminações microbiológicas podem comprometer

seriamente a imagem do produto brasileiro, prejudicando as futuras exportações.

A existência dos serviços de inspeção traduz-se na necessidade da observância de normas, padrões e legislações compatíveis com a realidade de cada país, com os objetivos de: zelar pela saúde do consumidor, garantir o comércio leal (face à uniformidade dos procedimentos), reduzir as perdas e oferecer condições para a aceitabilidade do pescado e seus derivados (FAULHABER, 1988).

A decomposição bacteriana do pescado ocorre normalmente a partir da flora marinha ou fluvial, que não é patogênica para o homem, com espécies de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e Corineforme. No entanto, existem duas situações em que o problema se torna grave em relação ao homem. Uma é quando a pesca é feita em águas poluídas por esgotos e outra quando o produto é muito manipulado pelo homem antes de ser consumido (RIEDEL, 2005).

Segundo Sikorski (1994) é de grande importância para a qualidade do pescado como alimento, as circunstâncias de captura, pois podem induzir um metabolismo anaeróbico e a alteração do estado de acidez em seus músculos quando resistem a esse processo. O pescado morto sem sofrimento, com rapidez e bem refrigerado estará livre dessas mudanças bioquímicas que afetarão sua degradação natural.

3. Análise sensorial do pescado

A análise sensorial foi definida em 1975 pela Divisão de Análise Sensorial do Instituto dos Tecnologistas de Alimentos dos EUA como uma

disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações das características dos alimentos e materiais quando são percebidos pelos órgãos dos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (MORI, 1988).

O exame sensorial tem papel fundamental em qualquer programa de controle de qualidade de alimentos, visto ser ele um fator determinante da aceitação do produto. Os caracteres sensoriais envolvem o aspecto, a cor, o cheiro ou odor, e o sabor do produto. Se tais caracteres se apresentarem alterados, o alimento será considerado impróprio para o consumo (TAVARES et al., 1988).

A análise sensorial é a avaliação mais freqüente no dia a dia da indústria de pesca, pela necessidade da rapidez no julgamento de lotes de matéria-prima e do produto acabado, bem como pela facilidade de execução (RUIVO, 1988).

As mudanças da coloração superficial nos crustáceos, como na tonalidade alterada na carne, resultam principalmente pela oxidação enzimática e não enzimática (SIKORSKI, 1994).

O escurecimento não enzimático pode ocorrer durante a cocção, em algumas espécies marinhas ricas em ribose, escurecendo o produto, provocando odores, sabores indesejáveis e a perda do valor nutritivo. Inicia-se essencialmente a partir de reações de açúcares redutores com compostos carbonílicos, especialmente aldeídos e cetonas. Esse processo é conhecido como reação de Maillard (KAI e MORAIS, 1988).

Kai e Morais (1988) definiram ainda o escurecimento enzimático como a transformação, em suas primeiras etapas, de compostos fenólicos em polímeros coloridos, freqüentemente pardos ou negros. O mais importante, no

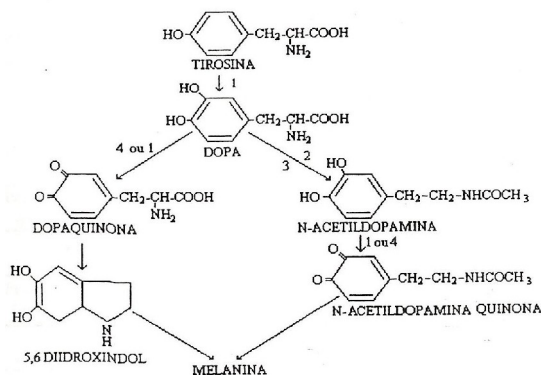
caso do pescado, é a ocorrência de manchas pretas, ou melanose, no camarão, provocada pela melanina.

4. Melanose em crustáceos

4.1. Surgimento da melanose

Segundo Carvalho et al. (2005) melanose é uma reação química natural que ocorre nos camarões e resulta na coloração escura na carapaça e, em graus mais avançados, no músculo dos animais. A melanina é uma substância com poder bactericida que surge devido a uma reação oxienzimática (tirosina-substrato monofenol com a enzima polifenol oxidase).

No mecanismo de ocorrência de manchas pretas (melanose) em lagostas e camarões, o ponto principal parece dizer respeito às condições de morte do animal. Quando este morre sob circunstâncias anormais, a exemplo de traumatismo e estresse, ocorre formação de melanina por via de reações enzimáticas oxidativas, durante estocagem. Somente uma pequena parte dos animais capturados apresenta sinais de manchas pretas, quando estas deveriam incidir mais significativamente. Isto parece indicar que indivíduos vivos apresentam um mecanismo de defesa característico que condiciona a melanose (OGAWA e DINIZ, 1999).



De acordo com Marshall (apud CARVALHO et al., 2005) os crustáceos utilizam a polifenol oxidase (PPO) para funções fisiológicas importantes no seu desenvolvimento. A PPO é importante para o endurecimento da carapaça dos animais (esclerotização) após a muda e também é responsável pela cicatrização de ferimentos. No entanto, o escurecimento catalisado pela PPO após a despesca afeta a qualidade e a aceitação dos camarões.

A distribuição do substrato e enzimas (polifenol oxidase - PPO) no camarão que não sofreu dano físico ou estresse antes de morrer é uniforme, e nesta condição se após a despesca forem adotados os procedimentos corretos de choque térmico, tratamento com metabissulfito, acondicionamento, transporte e congelamento, não ocorrerá a melanose (CARVALHO et al., 2005).

De acordo com Silva (1988) melanose, mancha preta ou “black spot”, são termos utilizados para explicar as reações de escurecimento ocorridas em crustáceos. Tem sua origem por atividade enzimática e não microbiana. Temperatura elevada, pH 6 a 8 e a presença de oxigênio, favorecem ainda mais essa reação. Além disso, o autor esclarece que a tirosina, presente naturalmente no fígado do camarão, é oxidada pela tirosinase, presente em grandes quantidades no sistema digestivo do crustáceo, que na ausência de sais de sulfito tem suas reações aceleradas, causando o escurecimento.

Nort (1988) confirma que as manchas pretas ou “black spot” são causadas por reações enzimáticas (fenolases) de óxido redução entre substâncias presentes, principalmente no cefalotórax do camarão, juntamente com pigmentos de melanina.

Igualmente Maia (2004) definiu a melanose ou “black spot” como o resultado de uma reação química natural de descoloração do camarão e o aparecimento de manchas pretas. Tal escurecimento deve-se ao aparecimento de estruturas melanínicas formadas pela oxidação de compostos do tipo mono e polifenóis, através de reações enzimáticas na presença de oxigênio molecular.

Em crustáceos, quando a distribuição dos componentes responsáveis pelo surgimento das manchas pretas é uniforme não se desenvolve a melanose. Entretanto, quando o animal sofre alguma situação anormal antes de morrer, sobretudo traumatismos como pancadas e ferimentos e estresse, ocorre um desequilíbrio, concentrando-se os componentes para reparação no local traumatizado que na presença de O₂ e do metal catalizador (Cu) da hemocianina, desencadeiam o processo de melanose (OGAWA, 1987).

4.2. Prevenção da melanose

4.2.1. Uso de sulfitos e ácido ascórbico

Na carcinicultura é comum o uso de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅) com a finalidade de evitar o aparecimento da melanose (GÓES et al., 2006).

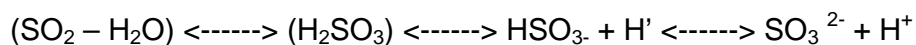
Silva (apud GÓES et al., 2006) ressalta que o metabissulfito de sódio é o conservante de maior estabilidade e que apresenta a maior quantidade de dióxido de enxofre (SO₂), quando diluído em água.

A FDA (Food and Drug Administration - EUA) reconhece a necessidade do metabissulfito de sódio para a indústria de camarão e recomenda a imersão

por 1 min em uma solução de metabissulfito de sódio a 1,25% como uma boa prática de fabricação (FINNE et al., 1986).

Segundo Silva (apud GÓES et al., 2006) o procedimento preconizado pelo FDA é a rejeição de todo o lote mesmo que apenas uma das amostras analisadas apresente valores superiores a 100 ppm de SO₂, porque poderá ocasionar crises de asma, reações cutâneas (urticárias), diarréias, choque anafilático, dores de cabeça, dores abdominais, náuseas e tonturas em indivíduos sensíveis.

Os agentes sulfúricos são os antimelanósicos mais utilizados na indústria alimentícia. Trata-se de diversas formas de sulfitos inorgânicos, incluindo o dióxido de enxofre (SO₂). Na solução aquosa, o SO₂ e os sais de sulfito formam ácido sulfuroso, que está em equilíbrio com formas iônicas de bissulfito e sulfito, liberando prótons de hidrogênio (MARCOS e MAQUEDA, 2003).



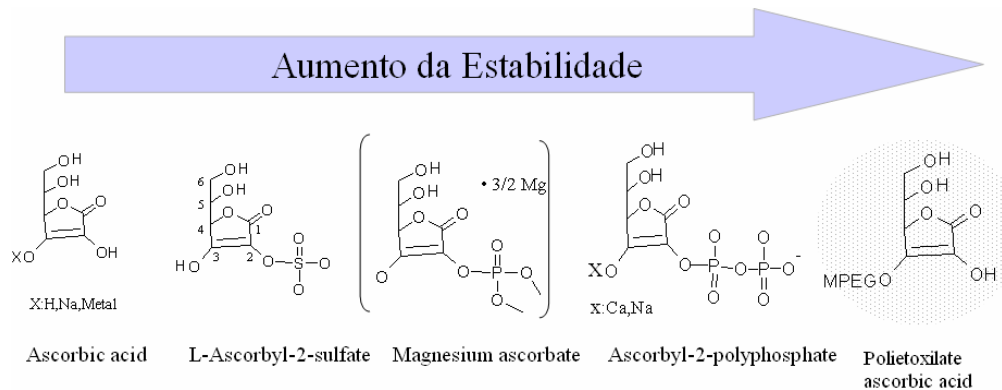
Ogawa e Diniz (1999) ressaltam que substâncias redutoras tais como sulfitos, ácido ascórbico são usualmente empregados no controle de manchas pretas em camarão, dadas suas propriedades de reduzirem imediatamente orto-quinona, retardando assim a formação da melanose.

O mecanismo de inibição da melanose em crustáceos pelo ácido ascórbico é atribuído pela redução das moléculas de o-quinonas formadas enzimaticamente, revertendo à reação oxidativa até seus precursores, os difenóis e, como consequência, prevenindo a formação da melanose (MARCOS e MAQUEDA, 2003).

Os mesmos autores Marcos e Maqueda (2003) ainda relatam que o único inconveniente do ácido ascórbico é de se oxidar de forma irreversível

para ácido dehidroascórbico, reduzindo assim, o poder antioxidante da vitamina C esgotando à medida que a reação enzimática avança no processo de escurecimento.

Porém, alguns produtos formulados a partir do polietileno glicol com ácido ascórbico dão origem ao ácido ascórbico polietoxilato, garantindo uma maior estabilidade da molécula.



Aplicação biotécnica do PEG



5. Reações bioquímicas após a morte do pescado

O glicogênio é o carboidrato de estoque dos músculos de animais de sangue quente e dos pescados. Sua degradação produz energia (ATP) através de uma seqüência de reações enzimáticas que podem ser do tipo anaeróbico ou aeróbico. A diminuição do suprimento de O₂, após a morte, direciona a glicólise para o mecanismo anaeróbico (GUZMÁN, 1994).

Cheftel e Cheftel (1976) salientam que após a morte do pescado surge a glicólise anaeróbica, nestas condições em vez do glicogênio degradar-se em água e anidrido carbônico, com geração de ATP a partir do ADP, se transforma em ácido lático. As quantidades de ATP produzidas pela glicólise anaeróbica

não são suficientes para compensar as perdas resultantes de sua hidrólise pela ATPase sarcoplasmática. A formação de ácido láctico origina um decréscimo do pH, inibindo diversas enzimas especialmente a fosforilase. No final da reação, o processo de glicólise é inibido e o conteúdo de ATP se aproxima da esgotabilidade.

Os mesmos autores Cheftel e Cheftel (1976) afirmam que com a ausência de ATP, a actina e miosina se unem de forma irreversível formando a actomiosina, ocasionando a rigidez no músculo (*rigor-mortis*).

O estado de *rigor-mortis* é definido como a perda da elasticidade e extensibilidade dos músculos como resultado da alteração dos ciclos de contração e relaxamento (GUZMÁN, 1994).

As taxas de fosfato orgânico e hidratos de carbono presentes na carne do pescado recém capturado são afetados, principalmente pelas condições de captura que o pescado é submetido. O cansaço muscular durante a captura, provoca o esgotamento das reservas de ATP e creatina – fosfato, assim como de glicogênio (SIKORSKI, 1994).

Os animais submetidos às condições de “stress” antes de sua morte, ocasionam a perda de glicogênio e por conseqüência há um rápido decréscimo da quantidade de ATP no músculo. Em seguida, ocorre o enrijecimento do músculo ao máximo, diminuindo muito a capacidade de retenção da água e a acidez da carne é relativamente pequena. Com essa reação, a qualidade microbiológica está comprometida, pois o aumento do pH facilita a proliferação da flora microbiana existente no pescado (CHEFTEL e CHEFTEL, 1976).

5.1. O estado de frescor

O frescor do pescado está relacionado às mudanças bioquímicas que acontecem mesmo em condições assépticas, através de enzimas de degradação (EHIRA, 1976). A perda do frescor no músculo, geralmente depende da temperatura e do tempo de estocagem (KAMINISHI et al., 2000).

Igualmente Guzmán (1994) afirma que a conservação do pescado armazenado é avaliada por uma série de parâmetros físicos, bioquímicos, microbiológicos e sensoriais, cujos valores no tempo de estocagem são comparados com a matéria-prima que não apresentou deterioração no tempo inicial (recém-capturado).

A rápida alteração no frescor depende de alguns fatores como o local de captura e o tamanho do pescado, a quantidade de lipídeos presentes no produto, a forma de captura, a carga bacteriana presente e a temperatura de estocagem (LOSADA et al., 2005).

Mendes et al. (2001) relata que a deterioração do pescado tem sido avaliada tradicionalmente pelo acompanhamento dos níveis de nitrogênio da trimetilamina e das bases voláteis totais. Entretanto, Botta (apud MENDES et al., 2001) reporta que para a maioria das espécies de pescado esse critério de avaliação do frescor não é suficiente, visto que ocorre pela deterioração bacteriana. Enquanto que, um dos principais índices desse tipo de avaliação em pescado ocorre em associação com as reações autolíticas ocasionadas por enzimas endógenas.

Conforme Guzmán (1994), a determinação da Hx (hipoxantina) formada da HxR (inosina) e AdR (adenina aminoidrolase) nas últimas etapas da degradação do ATP, é uma alternativa para a avaliação do frescor do pescado.

Amlacher e Huss (apud ALMEIDA et al., 2005) confirmam que as mudanças autolíticas ocorrem no pescado através de dois tipos de deterioração: enzimática e bacteriológica. As atividades enzimáticas individuais que participam da reação mediante as quais o ATP se degrada a hipoxantina, através de IMP e da inosina variando de espécie para espécie, depende da temperatura e do pH e, também, de outros fatores como as condições de manipulação, com o estado físico do pescado antes de capturá-lo, dos métodos de captura e da maneira como são sacrificados.

Entre outros métodos, os nucleotídeos produzidos pela decomposição de adenosina trifosfato (ATP) são considerados os indicadores mais confiáveis de frescor (OGAWA et al., 1999).

Saito et al. (1956) registraram uma alta correlação entre a percentagem de inosina e hipoxantina sobre o total de ATP e compostos relacionados ao estágio inicial de frescor do pescado, e propôs uma constante K para determinação do frescor.

Igualmente Sikorski (1994), reporta que a Hx e o valor de K são os indicadores mais úteis na determinação do frescor, apesar de que a perda do frescor se deve a degradação enzimática e a atividade bacteriana. Uchiyama e Kobayashi (1974) descreveram o valor de K baseado na concentração de vários nucleotídeos e respectivos produtos da degradação.

O valor de K consiste num índice avaliado em termos da razão entre a concentração total de hipoxantina (Hx) e inosina (HxR) e o nível total de ATP e seus produtos de degradação do músculo, sendo usado como índice representativo do frescor da carne do pescado. Atualmente, este método é o mais apropriado para avaliação do frescor do pescado. A estimação do frescor

de peixes e crustáceos é muito importante na indústria de alimentos para a elaboração de produtos de alta qualidade (OGAWA et al., 1999).

Agustini et al. (2001) asseguram que o valor de K é um índice bioquímico utilizado para avaliar a qualidade do pescado, baseado nas mudanças de nucleotídeos, expressos em porcentagem a partir da quantidade de inosina (HxR) e hipoxantina (Hx) e os valores totais de adenosina 5 - tri-, di-, mono-fosfato (ATP, ADP, AMP), inosina mono-fosfato (IMP), HxR e Hx. Esses autores confirmam que o valor de K tem sido muito utilizado no Japão como o único índice de frescor para avaliar as mudanças na qualidade do pescado após a captura e durante a estocagem.

5.2. Trimetilamina (TMA)

Conforme Huss (1988), um dos métodos químicos mais usados para avaliar a qualidade do pescado é a determinação de nitrogênio da trimetilamina (TMA), que é um dos compostos básicos voláteis que se encontra em quantidade muito pequena no pescado marinho fresco, mas que se acumula durante a sua deterioração pós-morte. A TMA é originária, principalmente, da redução do óxido de trimetilamina (OTMA) por ação enzimática produzidas por bactérias deteriorantes.

O OTMA existe em quantidade variável nas diferentes espécies sendo particularmente elevado nos cações e arraias, nos quais atinge até 1500mg/100g. Na corvina, pescada, pargo e outros peixes de carne branca também apresenta-se com elevados valores entre 200 e 300mg/100g. No atum encontra-se quantidades abaixo de 20mg/100g, porém nos peixes de

parentesco próximo, como bonito, serra, cavala, os teores de OTMA estão entre 20 e 60mg/100g (GUZMÁN, 1988).

Três funções têm sido sugeridas para explicar porque os peixes e crustáceos marinhos consomem, armazenam e sintetizam o óxido de trimetilamina (OTMA): regulador osmótico, agente desintoxicante e estabilizante de macromoléculas (GUZMÁN, 1994).

Kimura et al. (2003) asseguram que o óxido de trimetilamina (OTMA) é um regulador osmótico natural, está presente na maioria das espécies marinhas, acumulado especialmente nos tecidos de elasmobrânquios, moluscos e crustáceos.

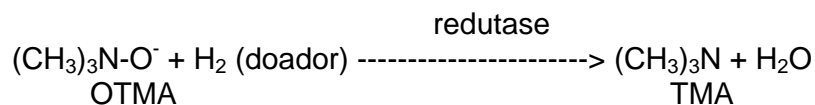
De acordo com Ogawa et al. (1999) a TMA é uma substância peculiar aos peixes e crustáceos marinhos e está distribuída principalmente nos músculos e vísceras. Após a morte do pescado, o óxido de trimetilamina é convertido em trimetilamina por ação de enzima redutase produzida por bactérias. Além de ser um bom indicador de deterioração para peixes e crustáceos, embora de uma maneira geral não possa ser aplicado para pescados de água doce, devido à quantidade de OTMA ser mínima. Além disso, a TMA é uma amina terciária do tipo R_3N na qual os radicais R são metilas (GUZMÁN, 1988).

Novamente Guzmán (1994), salienta que a condição primária para a formação de TMA é a existência em quantidade abundante de OTMA, como a que existe nos peixes ósseos de carne branca (linguado, corvina, castanha, pescada, merluza e abrótea), nos elasmobrânquios (cações e raias) e em alguns crustáceos e moluscos (camarão, lagosta, caranguejo, lula e polvo).

Em pescados frescos a TMA se encontra em pequenas quantidades, porém acumula-se durante a deterioração do pescado marinho, como resultado, principalmente, da redução bacteriana (EVANGELISTA, 1997).

Connell (apud CINTRA, 1996) comprovou que o pescado de água fria de boa qualidade, contém menos de 1,5mg/100g de TMA no pescado. Sendo geralmente considerado como limite de aceitabilidade para o consumo humano, um conteúdo de 4mg/100g, devendo salientar que estes valores são somente aplicados a pescados conservados em gelo.

Watson (apud GUZMÁN, 1994) sugeriu que a redução bacteriana do OTMA deveria ocorrer de acordo com a equação geral seguinte:



KIMURA et al. (2000) salientam que durante o rigor mortis no período de estocagem, o OTMA é reduzido a trimetilamina, dimetilamina (DMA) e formaldeído. O OTMA é inodoro enquanto a TMA apresenta odor característico (LEITÃO, 1988).

Hebard et al. (1982) afirmaram que peixes de água doce são conhecidos por não apresentarem óxido de trimetilamina no músculo. Entretanto, Shirai et al. (1998) quantificaram o OTMA e a TMA em pescados de água doce de diversas espécies, podendo ser utilizados como indicadores de deterioração.

De acordo com KIMURA et al. (2005) apesar do pescado de água doce possuir uma regulação osmótica diferente do pescado marinho, o de água doce apresenta quantidades relevantes de OTMA no músculo.

Considerando que o limite de TMA no pescado varia de acordo com as espécies, Sikorski (1994) salienta que o nível permitido de trimetilamina é de 5-10mg de N de TMA por 100g. Enquanto, Hebard et al. (1982) propuseram 5mg de N de TMA por 100g de carne.

Os teores de TMA em camarões são comumente baixos, só aumentam após o 8º dia, sem chegar a exceder os 5mg/100g, quando rejeitados sensorialmente (GUZMÁN, 1994).

Kietzmann et al. (1974) confirmam que a quantidade de TMA formada, depende, de uma parte, dos níveis de OTMA, constituinte fundamental, do número de bactérias que reduzem esse óxido, número cuja porcentagem dentro da flora bacteriana total do pescado pode variar. Tanto a quantidade de OTMA quanto o número e composição da flora bacteriana dependem principalmente da espécie, do local onde foi capturado, da época do ano, do procedimento de captura e do manejo durante seu beneficiamento.

5.3. Bases Voláteis Totais (BVT)

A determinação das bases voláteis totais (BVT) é um dos métodos mais utilizados na avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros. É um termo geral que inclui a medição da trimetilamina (produzida por deterioração bacteriana), dimetilamina (produzidas por enzimas autolíticas durante o armazenamento e congelamento), amônia (produzida pela desaminação de aminoácidos e catabólitos de nucleotídeos) e outros componentes nitrogenados básicos voláteis, associados com a deterioração de produtos pesqueiros (HUSS, 1999).

Reay e Shewan; Molteno et al. (apud GUZMÁN, 1994) observaram que além da amônia, as bases voláteis totais incluem trimetilamina, dimetilamina e, provavelmente, traços de monometilamina, propilamina, que se formam em etapas mais avançadas da decomposição.

Igualmente, Tavares et al. (1988) afirmam que o pescado refrigerado pode ser deteriorado pela ação enzimática e bacteriana, resultando na produção de vários compostos nitrogenados, sendo mais freqüentes a trimetilamina, a dimetilamina, a amônia e ácidos voláteis. O teor é dado pela determinação das bases voláteis, que aumenta em função da deterioração do produto.

Destas bases a que geralmente tem variação mais significativa é a TMA, portanto ela é a principal responsável pela mudança nos valores de BVT, durante a estocagem do pescado em gelo (TAHA, 1988).

Segundo Ogawa et al. (1999) para peixes em excelente estado de frescor, o teor de BVT atinge 5 a 10mg/100g de carne; peixes com frescor razoável podem atingir até 15 a 25mg/100g de carne. No início da putrefação, este teor pode ir até 30 a 40mg/100g e, quando deteriorado, tal conteúdo deve encontrar-se acima de 50mg/100g.

Neto (apud GUZMÁN, 1994) reportou que nos peixes de água doce, as BVT variam pouco e de maneira errática, não atingindo o valor de 30mg/100g, apesar de terem sido rejeitados sensorialmente.

O limite de aceitação das bases voláteis totais em pescado seria de 30mg de N por 100g de carne (TAVARES et al., 1988, SIKORSKI, 1994 e BRASIL, 1997).

5.4. Acompanhamento do pH

O ácido láctico gerado a partir do glicogênio após a morte do pescado, é a causa principal do decréscimo do pH no músculo durante o período de *rigor mortis* (SIKORSKI, 1994).

A medida do pH não deve ser utilizada individualmente como índice de frescor, pois pode induzir a falsa avaliação. No entanto, seus valores geralmente acompanham, paralelamente, análises químicas, microbiológicas e sensoriais (NORT, 1988).

A diminuição do pH no músculo durante o rigor mortis tem um efeito nas propriedades físicas no músculo do pescado. À medida que o pH diminui, a textura do músculo é modificada, ocorrendo sua desnaturação parcial e diminuindo a capacidade de retenção de água (HUSS, 1999).

A acidificação influencia a liberação de fosfatos inorgânicos e amoníacos tendo como consequência a degradação enzimática do ATP (SIKORSKI, 1994). Entretanto, à medida que o pH chega à neutralidade, as chances de alcançar a alcalinidade demonstram que o músculo está entrando em estado de decomposição (KIETZMANN et al., 1974).

De acordo com Matsumoto e Yamanaka (1990) é observado no estágio inicial de decomposição o declínio dos níveis de ácido láctico no pescado.

6. Deterioração bacteriana

6.1. Bactérias deteriorantes

Os organismos responsáveis por alterações no pescado são considerados aqueles que produzem maus odores quando crescem em culturas puras no músculo estéril (VIEIRA, 2004).

Entre os gêneros que fazem parte da microbiota natural do pescado podem ser citados *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Micrococcus*. Os mais importantes na deterioração desses alimentos são os gêneros *Pseudomonas* e *Shewanella*, principais responsáveis pelas alterações organolépticas do pescado devido à formação de trimetilamina, ésteres, substâncias voláteis reductoras e outros compostos com aroma pronunciado (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Logo após ser capturado, o pescado sofre uma série de modificações bioquímicas, as quais poderão favorecer o crescimento e a multiplicação das bactérias, naturalmente presentes em sua microbiota (VIEIRA, 2004).

A deterioração de crustáceos parece ser bastante similar à do peixe, começando nas partes externas devido à anatomia desses organismos. A presença de altas quantidades de aminoácidos livres torna-os extremamente suscetíveis ao rápido ataque de microbiota deteriorante. Como nos pescados, a deterioração é acompanhada pela produção de grandes quantidades de bases nitrogenadas voláteis. Algumas dessas bases originam-se da redução do óxido de trimetilamina presentes nos crustáceos (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O desenvolvimento bacteriano é sem dúvida um dos principais fatores que levam à deterioração. Durante o manuseio, o contato com gelo,

equipamentos e outros, podem modificar a microflora ou aumentá-la. A grande maioria destes microrganismos apresenta atividades proteolíticas e lipolíticas, contribuindo para a desintegração dos tecidos, levando a uma série de reações bioquímicas indesejáveis, provocando a total decomposição do pescado (KAI e MORAIS, 1988).

De acordo com Shewan (apud VIEIRA, 2004) durante a alteração do pescado, decresce o OTMA, a creatina, a taurina, a anserina, outros compostos afins e determinados aminoácidos, com produção de trimetilamina (TMA), amoníaco, histamina, ácido sulfídrico (H₂S), indol e outros.

Lerke (apud VIEIRA, 2004) afirma que foi demonstrado que *Pseudomonas*, e as bactérias *Moraxella* e *Acinetobacter* têm particular importância no desencadeamento do processo de deterioração do pescado.

Leitão (1988) salienta que características como a forma, tamanho e teor de gordura no pescado parecem influir na sua maior ou menor perecibilidade.

6.2. Bactérias patogênicas

Gelli (1988) ressalva que a certificação do pescado, no que diz respeito a agentes microbiológicos e aos padrões de qualidade, inclui basicamente a *Salmonella spp* e o *Vibrio parahemolyticus*, pois são microrganismos potencialmente capazes de causar doenças transmitidas pelo consumo de pescado.

A *Salmonella spp* não existe originalmente no pescado, no entanto o consumo desse alimento já causou inúmeras intoxicações alimentares (SIKORSKI, 1994).

O *Vibrio parahaemolyticus* causa gastroenterite e está associado com alimentos de origem marinha, principalmente quando consumidos crus ou inadequadamente cozidos (VIEIRA, 2004). Chen e Hanna (apud VIEIRA, 2004) ressaltam que esse patógeno tem sido associado com processos infecciosos em peixes marinhos, caranguejos, camarões e ostras.

Ogawa (1999) reportou que bactérias do gênero *Vibrio* psicrófilos são detectados em qualquer época do ano e no verão, encontram-se mais mesófilos. A atividade de deterioração dessa bactéria é inferior a de *Pseudomonas* e algumas espécies dão um forte odor de putrefação.

A *Escherichia coli* é a principal bactéria representante do grupo coliforme fecais. É considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal e da eventual presença de organismos patogênicos (BRASIL, 2001).

Novamente Gelli (1988) afirma que o microorganismo *Staphylococcus aureus* é indicador de manipulação inadequada e que também está incluído nos que podem oferecer risco ao consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Matéria prima

Foram adquiridos camarões vivos da espécie *Litopenaeus vannamei* de cultivos provenientes de uma fazenda a 6 km do município de Paracuru no Estado do Ceará, e por outra fazenda no município de Acaraú-CE.

2. Metodologia

2.1. *Uso do ácido ascórbico polietoxilato como conservante e inibidor de melanose*

Foi testado o ácido ascórbico polietoxilato comercial como um conservante e inibidor de melanose em camarão comparando-se a sua eficiência com a do metabissulfito de sódio, produto atualmente usado com essa finalidade. Para isso, imediatamente após a despesca, os camarões foram imersos em soluções de quatro diferentes concentrações do produto ácido ascórbico a 200, 300, 400 e 500 ppm, uma de metabissulfito de sódio a 6%, cuja concentração é usada nas fazendas locais e um controle sem uso de produto químico. As concentrações do produto (ácido ascórbico polietoxilato comercial) foram estabelecidas de acordo com Nagaoka e Tanaka (1962) e especificações do fabricante. As referidas soluções foram preparadas em água

e adicionadas gelo em cada recipiente de imersão na proporção de 1:2, respectivamente.

1. Tratamento (TM) – solução de imersão com metabissulfito de sódio a 6%.
2. Tratamento (TAI) – solução de imersão com ácido ascórbico a 200ppm.
3. Tratamento (TAII) – solução de imersão com ácido ascórbico a 300ppm.
4. Tratamento (TAIII) – solução de imersão com ácido ascórbico a 400ppm.
5. Tratamento (TAIV) – solução de imersão com ácido ascórbico a 500ppm.
6. Controle (TC) – solução de imersão apenas com água e gelo na proporção de 1:2.

Após o preparo das soluções de imersão em recipientes plásticos devidamente identificados, os camarões foram imersos por vinte minutos. Foram distribuídos 180 camarões em cada recipiente e a temperatura das soluções era de 2°C.

Logo em seguida, os camarões foram armazenados em embalagens plásticas identificadas e transportados até o laboratório em caixas de isopor sob diferentes camadas de gelo.

No laboratório, os crustáceos submetidos aos diferentes tratamentos foram estocados em gelo em recipientes plásticos vazados de formato retangular, e posteriormente conservados em refrigeradores na temperatura de 4°C por vinte dias.

A cada 48 horas foram retiradas amostras para análises microbiológicas, físico-químicas e caracteres sensoriais.

3. Observação dos caracteres sensoriais

Durante o período de estocagem em gelo, a cada 48h foram retirados de cada tratamento 15 exemplares de camarão para observação de modificações na coloração da cabeça – vermelha e preta, afrouxamento do cefalotórax, surgimento de melanose e alterações no odor, textura e cor da carne.

No decorrer das análises sensoriais dos camarões, analisamos o efeito do ácido ascórbico polietoxilato em diversas concentrações na prevenção da melanose, comparando os resultados com a eficiência do metabissulfito de sódio na concentração de 6%, durante estocagem em gelo.

3.1. Análises sensoriais

3.1.1. Análises objetivas

Durante a análise sensorial objetiva foram avaliadas as alterações nas características físicas dos atributos cor, odor e textura dos camarões, usando-se a escala numérica de acordo com a Tabela 1 adaptada por Nort (1973) a partir do modelo para pescado fresco descrito no código de práticas pela “Torry Research Station”.

Tabela 1 – Escala numérica para acompanhar as alterações nas características físicas dos camarões após tratamento com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, seguida de estocagem em gelo.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	Nº de pontos
Cor (5 pontos)	
- Carne límpida, translúcida e brilhosa.	5
- Perda do brilho habitual, coloração normal.	3
- Coloração branca leitosa.	2
- Cor tornando-se escura.	1
Odor (10 pontos)	
- Excelente, próprio do camarão.	10
- Cheiro regular, perda de odor próprio do camarão recém-morto.	8
- Inferior ao anterior, porém sem indícios de cheiros estranhos.	6
- Leve cheiro estranho, início de cheiro desagradável.	2
- Cheiro pútrido	0
Textura (10 pontos)	
- Carne firmemente aderida à carapaça, elástica ao toque dos dedos	10
- Diminuição da aderência da carne à carapaça – início de amolecimento da carne, desligamento do cefalotórax	8
- Carne mole, flácida, facilmente destacável da carapaça, superfície da carne escorregadia.	6
- Carne muito mole e flácida.	2

3.1.2. Análises subjetivas

Nas análises subjetivas a melanose foi identificada por sinais de presença, ausência e grau de surgimento, como descrito na Tabela 2, de acordo com Perdigão et al. (1984).

4. Análises físico-químicas

Foram realizadas análises da determinação do valor de K, quantificação da trimetilamina (TMA) e das bases voláteis totais (BVT), e acompanhamento do pH na parte comestível do camarão. Todas as análises foram realizadas em triplicada para maior confiabilidade dos resultados.

4.1. Determinação do valor de K

O valor de K foi analisado segundo Uchiyama e Kobayashi (1974) por cromatografia em coluna, segundo Anexo 2. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 250nm e calculada através da fórmula abaixo:

$$\text{Valor de K} = \frac{HxR + Hx}{ATP+ADP+AMP+IMP+HxR+Hx} \times 100$$

4.2. Quantificação da trimetilamina

A determinação TMA, conforme Anexo 3, foi realizada pelo método de Dyer descrito por Woyewoda et al. (1986).

4.3. Quantificação das bases voláteis totais

A quantificação das bases voláteis totais, conforme Anexo 4, foi feita de acordo com o método descrito por Tavares et al. (1988).

4.4. Acompanhamento do pH

Foi preparado um homogenato na proporção de 1:2 de músculo do camarão macerado e água destilada fervida na temperatura ambiente, respectivamente. A medição do pH foi realizada através de um potenciômetro, durante o mesmo período das análises anteriores.

5. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas constaram da contagem padrão de bactérias mesófilas em placas, de coliformes totais e fecais.

Amostras de 25g de músculo retiradas assepticamente de camarões foram distribuídas em água peptonada a 0,1% e homogeneizadas. A contagem padrão em placas (CPP) foi seguida de acordo à descrição feita por Silva et al. (1997), conforme Anexo 5. Os resultados foram acompanhados com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Alterações na qualidade do camarão estocado em gelo.

1.1. Análise sensorial

Os resultados das análises sensoriais utilizando a escala numérica descrita na Tabela 1, para os camarões submetidos aos diversos tratamentos, seguidos de estocagem em gelo por 22 dias, estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Análise sensorial do camarão *L. vannamei* durante estocagem em gelo.

Tratamentos	Análises Sensoriais	Estocagem (Dias)											
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
TM	Somatório dos escores	25	25	21	19	17	15	12	10	6	5	3	3
TAI		25	25	21	19	17	15	12	10	5	5	3	3
TAII		25	25	21	19	17	15	12	10	5	5	3	3
TAIII		25	25	21	19	17	15	12	10	6	5	3	3
TAIV		25	25	21	19	17	15	12	10	6	5	3	3
TC		25	25	21	19	17	15	12	10	5	5	3	3
Tratamentos	Subjetivas	Representação gradual											
TM	Melanose	-	-*	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
TAI		-	+*	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
TAII		-	+*	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
TAIII		-	+*	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
TAIV		-	-*	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
TC		-	+*	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

Legenda
 (-) ausência de melanose;
 (*) pontos vermelhos no cefalotórax;
 (+) melanose extremamente leve;
 (++) melanose leve;
 (+++) melanose severa;
 (++++) melanose extremamente severa;

Vieira (2004) reporta que um pescado para ser fresco precisa atingir o somatório de 25 pontos durante a avaliação sensorial, baseada na escala numérica adaptada por Nort (1973), a partir do modelo de “Torry Research Station”, citado no código de práticas para pescado fresco.

Verifica-se na Tabela 2 que a partir do 4º dia em todos os tratamentos, os camarões em suas respectivas estocagens não atingiram o somatório de 25 pontos. Sendo que, quanto mais próximo da escala de 25 pontos obtidos na avaliação dos atributos cor, odor e textura, o pescado é considerado fresco.

1.2. Análise sensorial objetiva e subjetiva entre os tratamentos com ácido ascórbico.

Na Figura 1 pode ser constatado que não houve diferença entre os tratamentos com ácido ascórbico nos quesitos cor, odor e textura durante os dias de conservação em gelo.

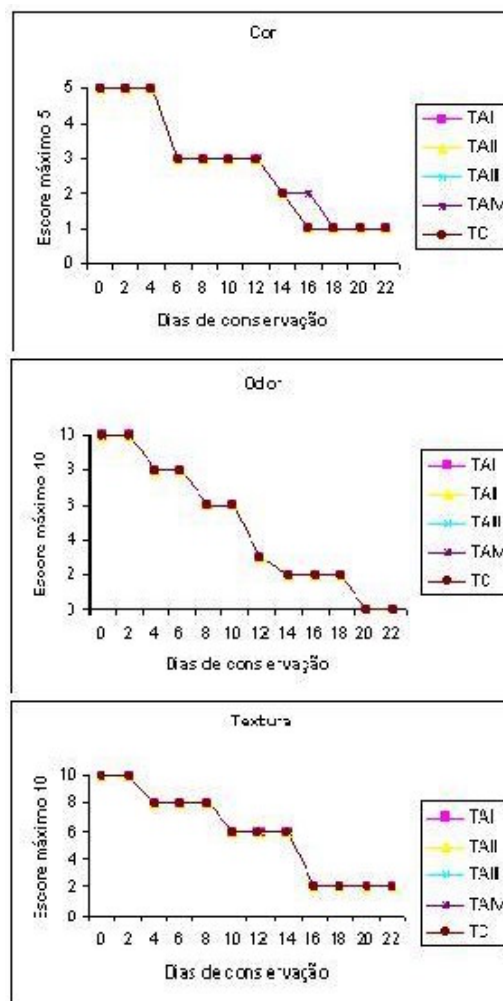


Figura 1: Representação dos parâmetros avaliados na análise sensorial.

Foi observado através da análise subjetiva que após 24 horas de estocagem em gelo, os camarões já apresentam manchas pretas, principalmente na cabeça.

No 2º dia de estocagem 93% dos camarões submetidos ao tratamento TAI apresentaram manchas pretas no cefalotórax. No 8º dia de estocagem, 26% dos camarões estavam com manchas pretas no abdômen e todos com o cefalotórax preto. Este tratamento foi menos eficiente quando comparado com os tratamentos de concentração mais elevadas.

Com relação às alterações objetivas dos parâmetros de cor da carne, odor e textura, foi verificado que até o 4º dia o produto é considerado fresco, entre o 4º e 14º dia os camarões são considerados aceitáveis para o consumo, porém a partir do 14º dia de estocagem em gelo inicia-se o estado de putrefação.

No tratamento TAI, no 1º dia de estocagem, a análise sensorial subjetiva mostrou que não houve diferença entre os tratamentos na análise dos caracteres sensoriais, e que 26% dos camarões apresentaram leves manchas pretas no cefalotórax e no 2º dia de estocagem o índice aumentou para 56%. Comparativamente, no tratamento TAI a proporção de camarões com mancha preta após 24 horas de estocagem foi superior. Mas a partir do 8º dia todos os camarões estavam com manchas pretas no cefalotórax e no abdômen.

No tratamento TAI, o índice de camarões com manchas pretas no cefalotórax foi de 26%, após 24 horas de estocagem, não havendo diferença relevante com o tratamento TAI. No 8º dia de estocagem foi verificado que 20% dos camarões apresentaram melanose no abdômen e todos com o cefalotórax com manchas pretas.

No entanto, o tratamento TAIV apresentou nas 24 horas de armazenagem em gelo 13% dos camarões com leves manchas pretas no cefalotórax, sendo que sua eficiência como inibidor de melanose na concentração utilizada foi a melhor entre os tratamentos com ácido ascórbico.

Quanto ao TC, após 24 horas de estocagem, 55% dos camarões estocados em gelo estavam com manchas pretas no cefalotórax, atingindo melanose severa no 10º dia e melanose extremamente severa no 14º dia de estocagem.

Ogawa et al. (1984) submeteram *Penaeus subtilis* a um tratamento de imersão com água e gelo por 15 min, seguido de estocagem em gelo. Durante as observações, verificaram que os camarões desenvolveram a melanose depois de 24 horas de estocagem.

Ainda no TC, no 3º dia de estocagem em gelo todos os camarões apresentaram manchas pretas no cefalotórax, enquanto que, no 8º dia, 20% estavam com manchas pretas no abdômen.

Nota-se que no 8º dia de estocagem todos os camarões apresentam manchas pretas no cefalotórax. Sendo que esse fato ocorre em todos os tratamentos com ácido ascórbico.

O surgimento de cabeça vermelha e afrouxamento do cefalotórax durante a estocagem em gelo, ocorreram em todos os tratamentos com ácido ascórbico.

1.3. Análise sensorial objetiva e subjetiva entre os tratamentos com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio.

Comparando a eficiência do metabissulfito de sódio (TM) e do ácido ascórbico (TAIV), tratamento com melhor desempenho entre o TAI, TAIL e TAILI na avaliação sensorial, foi constatado na análise objetiva que não houve diferença significativa entre os caracteres sensoriais, nos quesitos cor, odor e textura como destaca a Figura 2.

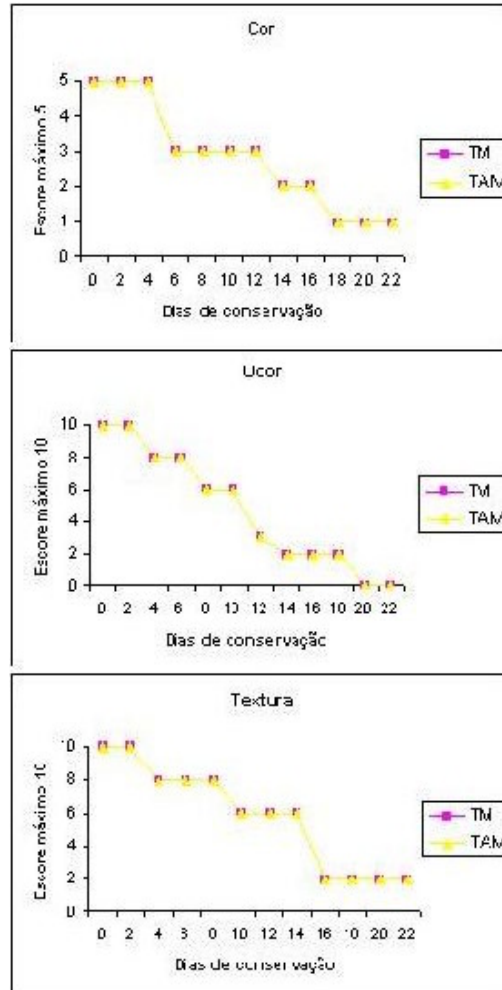


Figura 2: Representação dos parâmetros avaliados na análise sensorial nos tratamentos TM e TAIV.

No entanto foi verificado através da análise subjetiva, de acordo com a Tabela 2, que a inibição da melanose permaneceu dentro dos níveis aceitáveis entre o 4º e 14º dia de armazenagem em gelo. Desta forma, o TM foi mais eficaz na prevenção das manchas pretas do que TAIV durante a estocagem em gelo.

Durante o acompanhamento da estocagem dos camarões em gelo, foi observado que após 24 horas de estocagem em gelo, os camarões submetidos ao TM não apresentaram surgimento de melanose na cauda. Todavia no TAIV houve aparecimento melanose leve no cefalotórax.

Contudo, foi verificado mancha vermelha no cefalotórax, denominado de cabeça vermelha em todos os tratamentos. Na Figura 3, pode-se observar esse fenômeno.



Figura 3: Tratamento (TM) após 24 horas de estocagem em gelo.

Este fato contribui para as indústrias de processamento efetuar o descabeçamento dos camarões ocasionando perdas ao produtor.

De acordo com Fennema (1985), o rompimento das ligações dos pigmentos carotenóides com as proteínas, devido à atividade de algumas enzimas proteolíticas, ocasiona a liberação do pigmento astaxantina na sua cor avermelhada natural.

Depois de 48 horas foram observadas leves manchas pretas no cefalotórax em 20% dos camarões estocados.

No 4º dia de estocagem, observa-se também um leve desligamento do cefalotórax da cauda em todos os tratamentos. Na Figura 4 é possível observar que esse fato torna-se mais nítido a partir do 6º dia. Este defeito é prevenido mediante o resfriamento do camarão em quantidade de gelo adequada e o acondicionamento em camadas alternadas de gelo, sem pressioná-lo durante o empilhamento (CARVALHO et al., 2005).



Figura 4: Tratamento (TM) após 6 dias de estocagem em gelo.

Verificou-se através de amostragens que apenas no 12º dia, 13% dos camarões apresentaram manchas pretas na cauda. Além disso, 40% dos camarões apresentaram leves manchas pretas no cefalotórax.

A porcentagem de camarões com manchas pretas em todas as partes do corpo foi surgindo no decorrer dos dias de estocagem de forma mais acelerada a partir do 14º dia.

Meneses e Ogawa (1977) estocaram em gelo camarões da espécie *Penaeus schmitti*, imersos em solução com metabissulfito de sódio a 1,25%

durante 1 minuto, e observaram que o surgimento de melanose ocorreu a partir do 13º dia de armazenamento.

O metabissulfito de sódio inibe a formação da melanose mediante a eliminação do oxigênio e redução do pH, condições essenciais para a reação enzimática (CARVALHO et al., 2005).

Na Figura 5 é possível acompanhar a evolução da melanose no TM e TAIV durante a estocagem em gelo.

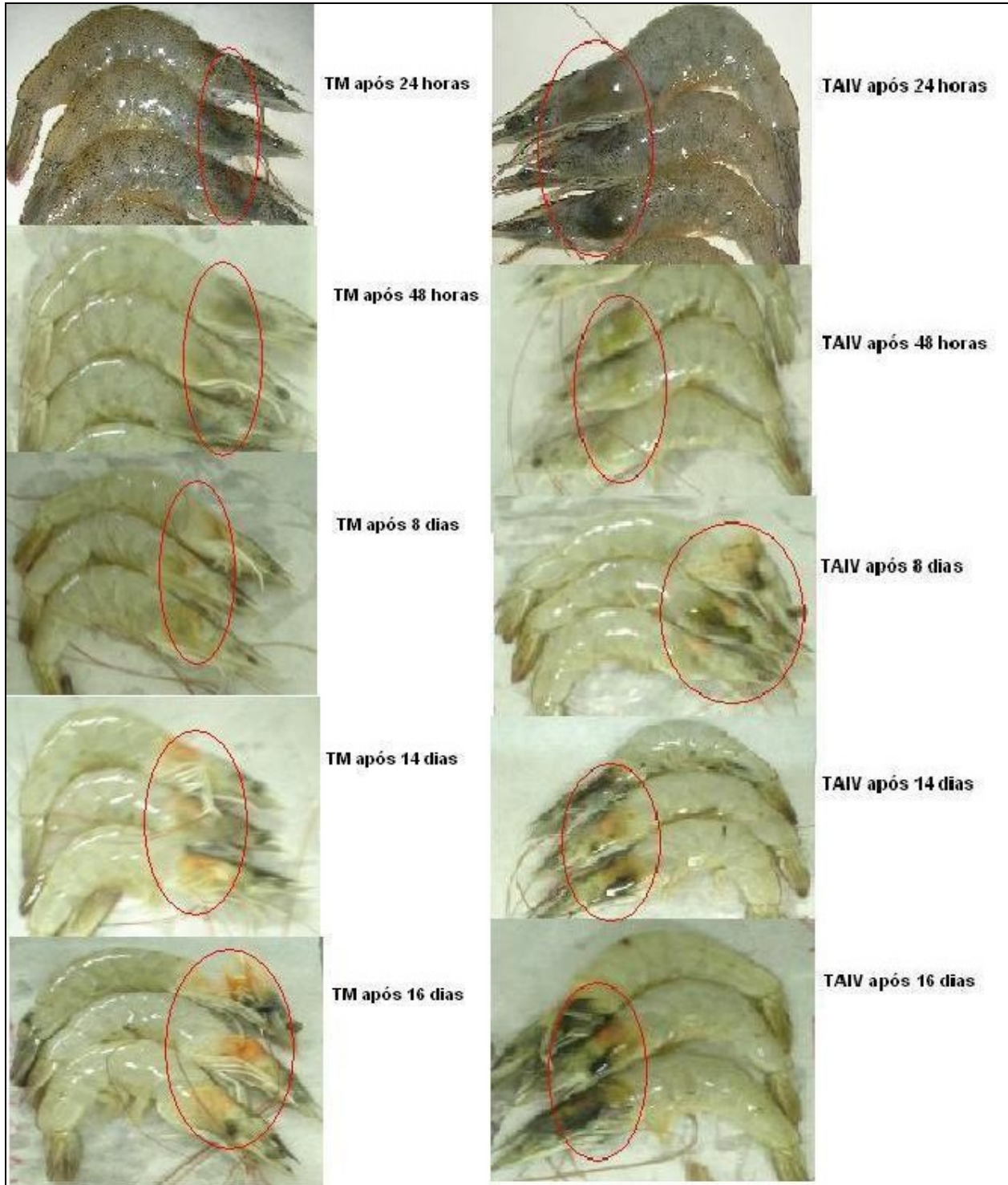


Figura 5: Representação gradual do surgimento da melanose no TM e TAIV durante estocagem em gelo.

2. Análises físico-químicas

Os resultados abaixo são referentes às amostras de músculo dos camarões tratados com metabissulfito de sódio a 6% e ácido ascórbico nas diferentes concentrações, estocados em gelo durante 22 dias.

Tabela 3: Valores médios de TMA, BVT, valor de K e pH em camarões estocados em gelo.

Parâmetros	Trata- mentos	Estocagem (Dias)										
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Valor de K (%)	TM	5,04	23,38	21,43	23,79	31,58	32,59	37,72	45,22	54,84	62,63	63,49
	TAI	12,29	23,03	25,54	27,14	36,07	32,14	36,97	51,36	56,54	54,76	63,92
	TAII	12,97	26,44	13,11	31,79	21,41	24,24	38,85	60,07	64,00	56,10	60,53
	TAIII	6,58	16,28	22,39	34,46	37,01	36,54	38,28	48,76	36,59	54,01	61,36
	TAIV	4,74	27,37	31,01	21,90	37,93	39,89	39,28	40,91	37,24	51,57	57,57
	TC	5,04	15,96	16,42	25,32	37,50	36,48	38,88	41,92	36,84	52,63	58,22
TMA (mg/100g)	TM	0,36	0,31	0,15	0,27	0,16	0,16	0,29	0,10	0,28	0,52	1,05
	TAI	0,44	0,31	0,32	0,11	0,11	0,40	0,23	0,21	0,41	0,66	1,32
	TAII	0,19	0,30	0,23	0,13	0,15	0,20	0,18	0,17	0,40	0,33	1,81
	TAIII	0,27	0,33	0,18	0,22	0,20	0,22	0,24	0,23	0,36	0,39	0,91
	TAIV	0,22	0,43	0,17	0,13	0,17	0,21	0,26	0,14	0,37	0,73	1,13
	C	0,32	0,28	0,20	0,18	0,20	0,20	0,35	0,35	0,37	0,38	0,70
BVT (mg/100g)	TM	8,00	13,06	16,26	14,13	15,20	15,20	14,66	17,06	25,33	17,60	24,79
	TAI	8,53	13,33	16,26	17,06	18,13	18,13	16,26	22,93	39,53	27,19	21,86
	TAII	5,6	14,13	14,13	17,06	18,93	18,93	13,86	19,46	31,99	27,99	29,33
	TAIII	7,20	15,73	14,13	14,13	15,46	16,00	15,20	19,73	23,19	26,39	27,99
	TAIV	10,13	14,93	9,86	13,86	13,86	15,42	13,86	17,33	22,66	25,33	25,59
	TC	9,86	14,66	13,06	10,40	14,66	15,20	15,20	16,80	20,53	23,99	26,93
pH	TM	6,75	7,09	7,04	7,26	7,38	7,48	7,72	7,31	7,59	7,40	7,71
	TAI	6,88	6,91	7,04	7,28	7,38	7,30	7,78	7,70	7,56	7,52	7,72
	TAII	6,88	6,74	7,15	7,32	7,38	7,58	7,60	7,63	7,44	7,54	7,77
	TAIII	6,57	6,99	7,47	7,38	7,27	7,57	7,65	7,88	7,85	7,73	7,67
	TAIV	6,76	6,77	7,10	7,59	7,30	7,53	7,65	7,53	7,83	7,60	7,70
	TC	6,52	6,94	7,38	7,41	7,02	7,44	7,57	7,68	7,70	7,43	7,50

2.1. Valor de K

O valor de K é um índice representativo do frescor da carne do pescado. Considerando-se todos os tratamentos experimentados com ácido ascórbico, os valores mínimos do valor de K variaram de 4,74 a 12,97% e no último dia de estocagem de 57,57 a 63,92% enquanto que no tratamento com metabissulfito de sódio (TM) o valor mínimo foi de 5,04% e de 63,49% o máximo. Quanto ao Tratamento Controle (TC) o valor de K mínimo foi de 5,04% e o máximo 58,22%, de acordo com a Tabela 3.

Comparando-se os dados obtidos dos tratamentos que utilizaram metabissulfito de sódio e ácido ascórbico com os do tratamento TC não foi possível observar nenhuma vantagem no uso dos referidos agentes químicos sobre os resultados do valor de K, ou seja, não retardaram com eficiência o declínio do frescor dos camarões analisados.

No que se refere ao estado de frescor dos camarões, de acordo com limites do valor de K apresentados por Ogawa et al. (1999), a partir do 4º dia de estocagem em gelo quando os valores começaram a ultrapassar 20%, os camarões não deveriam ser mais servidos crus como sushi e sashimi e sim cozidos para serem ingeridos. No final do período de estocagem em gelo (22º dia) os valores de K variaram de 57,57 a 63,92% ou seja, saindo do limite de aceitação para pescado ingerido cozido. De acordo com limites apresentados pelo mesmo autor, um valor de K de 60 a 80% já indica sinais de putrefação do pescado.

Losada et al. (2005) verificaram um crescimento do valor de K em pescados estocados em gelo a partir do 12º dia, sendo que no 15º dia o valor de K atingiu 60%.

Mendes et al. (2001) reportaram que em peixes e crustáceos após 72 horas estocados em gelo, podem apresentar o valor de K de até 58%, em outros casos os valores podem está entre 7 e 11%, isso depende dos níveis de estresse que os animais são submetidos durante a captura. Contudo, Almeida et al. (2005) observaram o valor de K inferior a 12% em pescados durante o 12º dia de estocagem indicando alto nível de frescor.

Mishima et al. (2005) reportaram que em determinadas espécies de pescados conservados a 0°C, o valor de K atingiu o índice de 3% após 24 horas de estocagem.

Matsumoto e Yamanaka (1990) observaram início de decomposição em camarões da espécie *Penaeus japonicus* estocados em gelo na temperatura de 0°C, a partir do 9º dia. Em estágio inicial de decomposição, o valor de K, TMA e BVT apresentaram os valores de 19%, 0,7 mg/100g e 26 mg/100g, respectivamente.

2.2. Trimetilamina (TMA) e Bases voláteis totais (BVT)

Mendes et al. (2001) relatam que a deterioração do pescado tem sido avaliada tradicionalmente pelo acompanhamento dos níveis de nitrogênio da trimetilamina e das bases voláteis totais.

Para o Tratamento Controle (TC) os valores iniciais de TMA e BVT foram de 0,32 e 9,86 mg/100g, respectivamente e os verificados no último dia de estocagem em gelo foram de 0,70 e 26,93mg/100g, respectivamente. Considerando-se todos os tratamentos com uso de ácido ascórbico, os valores iniciais variaram de 0,19 a 0,44mg/100g para TMA e 10,13mg/100g para BVT

enquanto que no último dia atingiram valores que variaram de 0,91 a 1,81mg/100g para TMA e 21,86 a 29,33mg/100g para BVT.

Para o tratamento com metabissulfito de sódio (TM) os valores de TMA foram respectivamente de 0,36mg/100g e de 1,05mg/100g para o 1º e último dia de estocagem enquanto para BVT foram de 8,00mg/100g e de 24,94mg/100g, respectivamente.

Comparando-se os tratamentos TM e TA com o controle (TC), não é possível observar valores diferenciados nos parâmetros TMA e BVT ao final do período de estocagem. Então, baseados nestes parâmetros, os tratamentos nas concentrações adotadas também não interferiram na qualidade dos camarões.

Por outro lado, de acordo com o parâmetro TMA a qualidade dos camarões não chegou a atingir o estado de deterioração até o final da estocagem, ou seja, não ultrapassando 5 a 10mg/100g limite sugerido para camarão por Sikorski (1994). Contudo, Hebard et al. (1982) reportaram que 5mg/100g é o limite máximo permitido.

Quanto aos valores de BVT, no final do experimento os valores se aproximaram do início de deterioração que é de 30mg/100g, conforme Ogawa et al (1999). De acordo também com Tavares et al. (1998), Sikorski (1994) e Brasil (1997), 30mg/100g é o limite de aceitação de BVT para pescado.

Entretanto, os valores encontrados tanto de BVT como de TMA podem estar reduzidos pelo efeito da lavagem pela água de degelo. Iyengar et al. (1960) verificaram que a quantidade de TMA em camarões estocados em gelo a 0°C diminuiu consideravelmente, devido ao efeito da lavagem pelo degelo durante a estocagem, uma vez que a TMA é solúvel em água.

Evangelista (1997) trabalhando com camarões marinhos *Penaeus schimitti*, *P. subtilis* e *Xiphopenaeus kroyeri* registrou valores iniciais de TMA na ordem de 0,34, 0,29 e 1,13 mg/100g, respectivamente. Entretanto, Shirai et al. (1998) encontraram para a espécie de água doce *Astronotus crassipinnis* até 118 mg/100g e 4 mg/100g de OTMA e TMA, respectivamente.

Ogawa et al. (1999) afirmam que em alguns crustáceos, no caso da lagosta, quando a TMA apresenta níveis a partir de 7,0mg/100g é detectado odor desagradável.

Matsumoto e Yamanaka (1990) quantificaram BVT em *Penaeus japonicus* estocados em gelo, e reportaram que no 2º dia de estocagem os níveis foram de 7,8mg/100g e no 11º dia de 27,5mg/100g.

Rahaman et al. (2001) observaram os níveis de BVT em camarões da espécie *Penaeus monodon* estocados em gelo, sendo que o valor inicial foi de 5,88mg/100g e no 10º dia foi de 32,76mg/100g.

2.3. pH

A tendência da não interferência dos tratamentos nos parâmetros de qualidade também foi repetida para os valores de pH. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, para o tratamento TM, verificou-se que o pH inicial foi de 6,75 aumentando para 7,71 no último dia de estocagem. Enquanto que para os tratamentos com ácido ascórbico o menor pH foi de 6,57 no TAIII e o maior de 7,77 no TAI. Comparando-se estes resultados com os do controle que foram de 6,52 inicialmente e 7,50 no final não se observa diferença considerável.

Bailey et al. (apud OGAWA et al., 1970) afirma que camarões com o pH do músculo inferior a 7,7, o produto pode ser considerado bom para o consumo; entre 7,7 e 7,95, simplesmente aceitável; acima de 7,95 já é inaceitável, pois se encontra deteriorado. Ainda assim, Rahaman et al. (2001) acompanharam o valor do pH na estocagem a 0°C do *Penaeus monodon*, sendo que no 2º dia o valor foi de 6,63 e no 11º dia de 7,28. No entanto, Kirschnik e Viegas (2004) observaram que camarões da espécie *Macrobrachium rosenbergii* apresentaram no 2º dia de estocagem em gelo, valores de pH de 7,01 no 2º dia e 7,36 no 10º dia.

As diferenças de pH, possivelmente, podem ser explicadas baseando-se na flora bacteriana que resulta em diferentes produtos da degradação de proteínas (IYENGAR et al. 1960).

Yamanaka (apud MATSUMOTO e YAMANAKA, 1990) salienta que a produção de ácido láctico após a morte do pescado contribui para a diminuição do pH, visto que é um dos índices de frescor do pescado.

Observa-se que à medida que o pH aumenta no decorrer dos dias de estocagem em gelo, surgem condições propícias à deterioração do pescado, pois determinadas faixas de pH facilitam o crescimento de alguns microrganismos que são responsáveis por mudanças bioquímicas em peixes e crustáceos. Conforme Guzmán (1994), o período em que o pH se mantém baixo, praticamente define a vida útil dos pescados.

O acompanhamento dos parâmetros físico-químicos, valor de K, TMA, BVT e pH de forma comparativa entre eles, facilitam na conclusão parcial da avaliação de controle de qualidade em pescados, visto que são dados responsáveis pela determinação do frescor do pescado. Essas análises

auxiliaram na verificação do tempo de conservação dos camarões em gelo. Desta forma, não houve diferença entre os tratamentos de imersão com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio nas análises físico-químicas durante a avaliação do surgimento de melanose.

Nas figuras 6, 7, 8 e 9 podemos visualizar o acompanhamento dos parâmetros bioquímicos em todos os tratamentos.

Em conformidade com a avaliação dos caracteres sensoriais, as análises de valor de K, TMA, BVT e pH mostraram que os camarões estocados em gelo estão dentro dos limites de aceitabilidade até o 16º dia de estocagem em gelo.

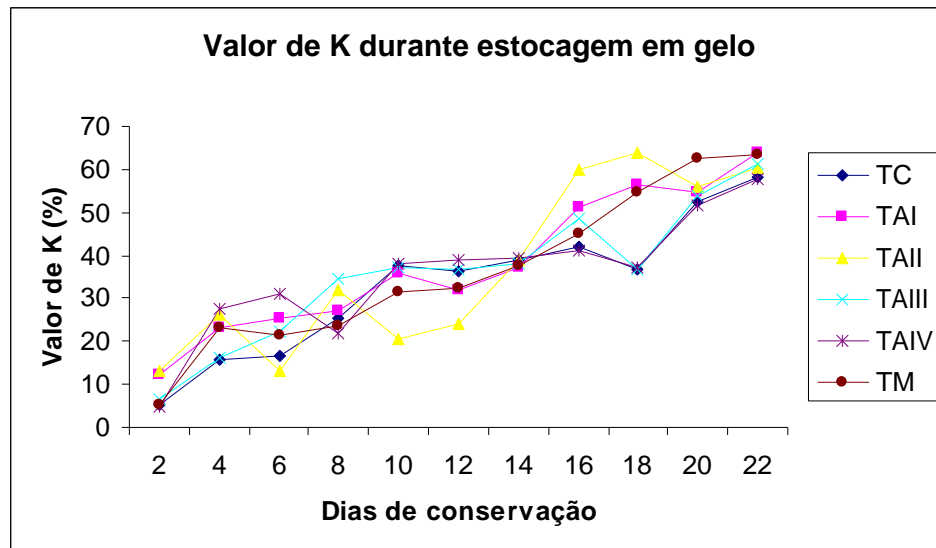


Figura 6: Valores dos níveis de valor de K em camarões estocados em gelo.

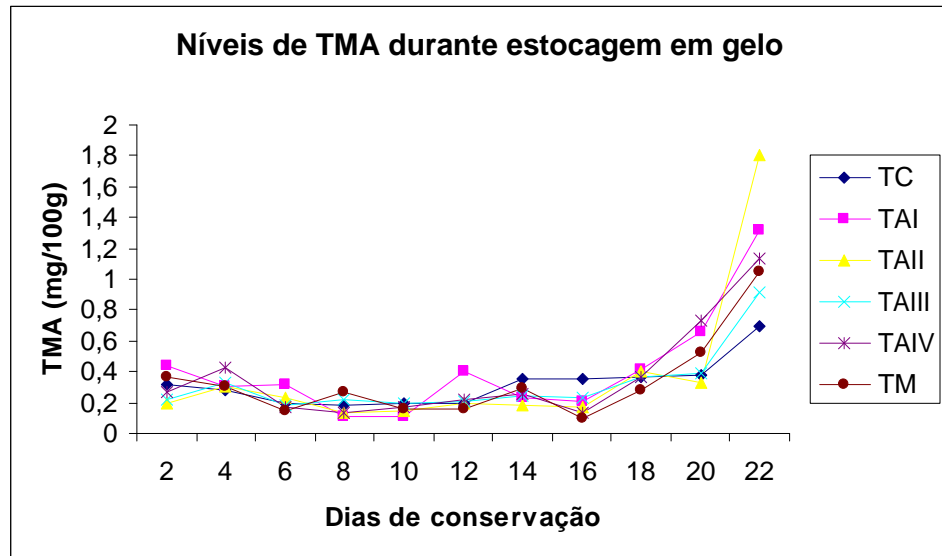


Figura 7: Valores dos níveis de TMA em camarões estocados em gelo.

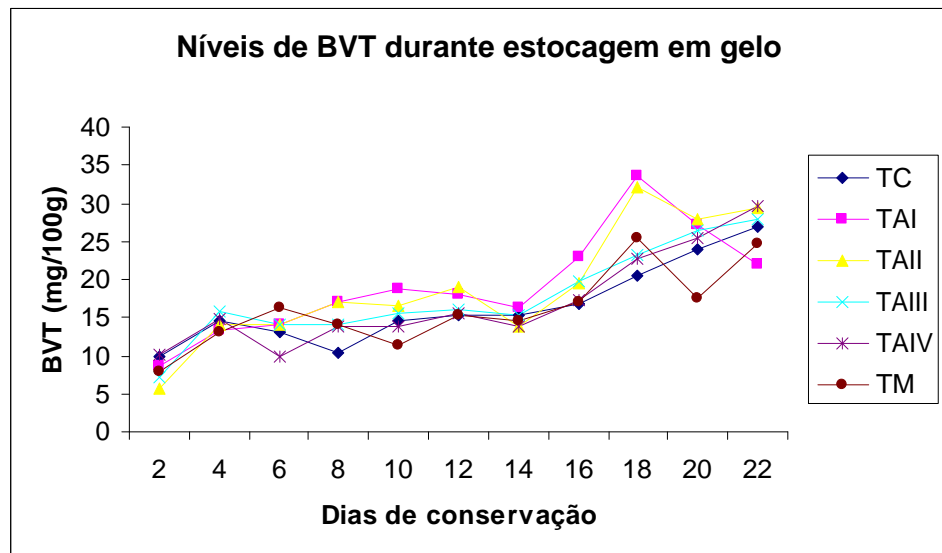


Figura 8: Valores dos níveis de BVT em camarões estocados em gelo.

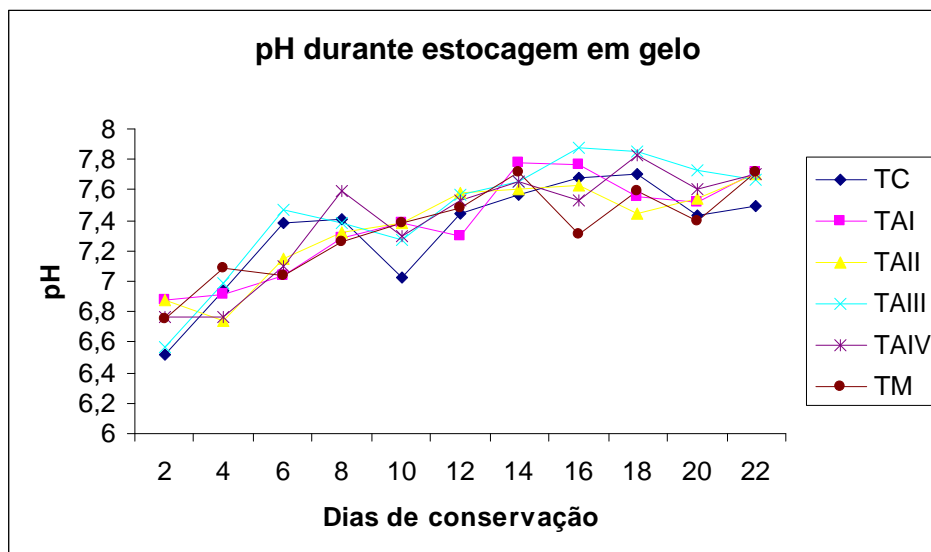


Figura 9: Valores dos níveis de pH em camarões estocados em gelo.

3. Análises microbiológicas

No decorrer do experimento foram coletadas assepticamente amostras de camarões submetidos aos tratamentos já mencionados e estocados em gelo. Após a estocagem foram feitas análises microbiológicas a cada intervalo de 48 horas.

Foi constatada a presença de coliformes fecais e totais durante o armazenamento do *L. vannamei* em gelo. A contagem padrão de bactérias não foi influenciada pelos tratamentos.

Verifica-se uma pequena variação durante os dias de estocagem nos valores do NMP/g e UFC/g de todos os tratamentos, como mostram as tabelas 4 e 5. Além disso, houve diferença entre os dados dos tratamentos TM, TAI e TAI, em relação aos tratamentos TAI, TAI e TC, pois os índices foram superiores. O motivo mais provável por tal variação entre valores seria que os camarões dos três primeiros tratamentos foram cultivados em salinidade 6ppt,

enquanto os dos tratamentos TAI, TAIV e TC foram cultivados em salinidade 45ppt. Todavia, os níveis permaneceram dentro dos padrões requeridos pela legislação brasileira.

Os padrões estabelecidos para pescados *in natura* resfriados ou congelados são de 10^3 /g para coliformes totais, 10^2 /g para coliformes fecais e 10^6 /g para contagem padrão de bactérias (BRASIL, 2001).

Ogawa et al. (1983) constataram em lagostas da espécie *Panulirus argus* estocadas em gelo, que a estimativa do NMP/g de coliformes foi extremamente alta, apesar de não ter influenciado nas investigações durante a avaliação da qualidade do produto.

No entanto, conforme Vieira (2004), pesquisas revelaram que nem sempre contagens de microrganismos determinam qualidade ou aceitabilidade do pescado, motivo porque as portarias mais recentes não limitam o número de bactérias em peixes e crustáceos. Este teste é mais usado para a avaliação da eficiência do processamento nas empresas de pesca, isto é, de quanto foi acrescido ou diminuído o número de bactérias durante as fases de industrialização.

Kirschnik e Viegas (2004) acompanharam o crescimento do NMP/g e UFC/g da microbiota do *M. rosenbergii* estocados em gelo, e observaram que houve um baixo crescimento microbiano.

Jeyasejaram et al. (2006) observaram a qualidade bacteriológica em *Penaeus indicus* estocados em gelo por 32 horas e constataram que o crescimento da flora bacteriana foi de forma significativa, porém não afetou o tempo de prateleira do produto durante o armazenamento.

As variações na contagem de bactérias mesófilas, de acordo com a figura 10 durante os dias de estocagem, ocorreram devido à lixiviação no derretimento do gelo utilizado na conservação, ocasionando uma variação na quantificação dos microorganismos.

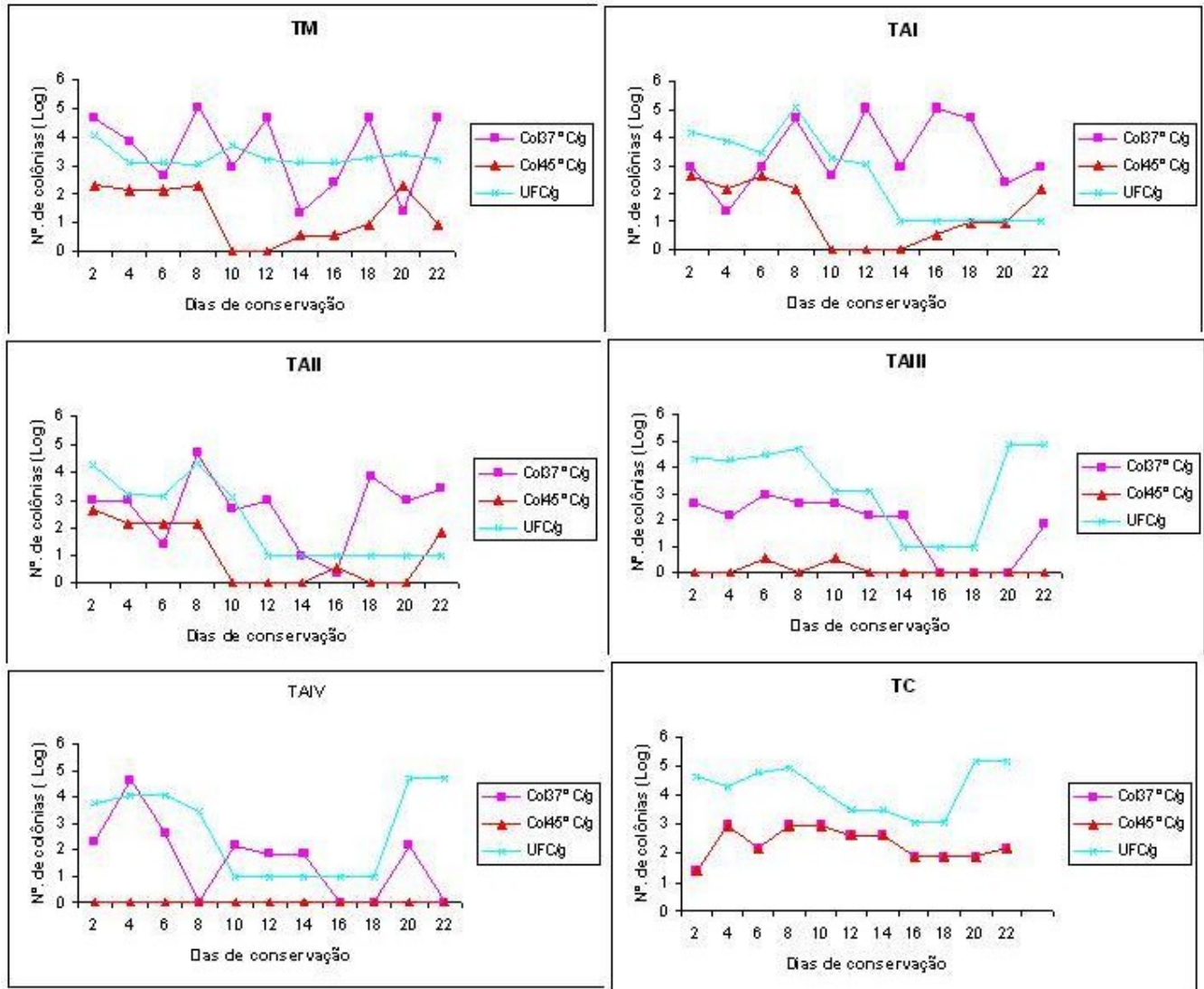


Figura 10: Representação logarítmica das contagens de bactérias mesófilas presentes nos camarões estocados em gelo.

CONCLUSÕES

1. Comprova-se que o tratamento TM (metabissulfito de sódio a 6%) foi mais eficiente na prevenção da melanose, pois as manchas pretas tardaram o seu surgimento após a imersão.
2. Os tratamentos com ácido ascórbico polietoxilato mostraram serem úteis no controle da melanose em concentrações acima de 400 ppm.
3. Apesar do ácido ascórbico polietoxilato ter mostrado bons resultados na prevenção da melanose, a necessidade de concentrações mais elevadas do produto com o objetivo de obter uma eficiência semelhante a do metabissulfito de sódio poderá tornar seu uso inviável, pois aumentará os custos na despesca das fazendas de cultivo, visto que o preço do ácido ascórbico em relação ao metabissulfito de sódio é mais elevado.
4. A análise sensorial dos camarões mostrou sinais de putrefação no 16º dia de estocagem em gelo, em todos os tratamentos.
5. Verifica-se pelas análises físico-químicas, que a partir do 16º dia os camarões estocados em gelo mostraram sinais de putrefação, indicando que o pescado não está em condições de ser consumido.
6. Durante a quantificação da trimetilamina (TMA), nota-se que o valor da mesma não é tão elevado como esperado, pois efeito lavagem do degelo pode ter ocasionado à perda do composto avaliado. Apesar da possível perda da TMA, observa-se um aumento significativo durante os dias de estocagem.

7. No acompanhamento das bases voláteis totais (BVT), atenta-se que em nenhum dos tratamentos foi observado um valor superior a 30mg/100g, que é o limite permitido pelo ministério da agricultura, porém os níveis de BVT até os últimos dias de estocagem estão próximos do valor aceitável sensorialmente.
8. O valor de K apresenta-se dentro dos níveis aceitáveis no controle do índice de frescor do pescado, mostrando valores elevados a partir do 16^o dia.
9. As contagens padrão de bactérias, de coliformes fecais e totais mostraram-se abaixo do padrão permitido pela legislação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC, 2006. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão. Recife: 2007 Disponível em <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2006.

AGUSTINI, T. W.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, T.; ISHIZAKI, S.; TANAKA, M.; TAKAI, R. Change of K value and water state of yellowfin tuna *Thunnus albacares* meat stored in a wide temperature range (20°C to -84°C). **Fisheries Science**. Japan, v. 67, p. 306-313, 2001.

ALBUQUERQUE, L. F.; VIDAL, M. P.; FILHO, O. C.; NASCIMENTO, C. A. O. do. Metabissulfito de sódio na despesca do camarão. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 95, p. 23-25, 2006.

ALMEIDA, N. M. de.; BATISTA, G. M.; KODAIRA, M.; VAL, A. L.; LESSI, E. Determinação do índice de *rigor-mortis* e sua relação com a degradação dos nucleotídeos em tambaqui (*Colossoma macropomum*), de piscicultura e conservados em gelo. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 698-704, 2005.

BAILEY, M. E.; FIEGER, E. A.; NOVAK, A. F. Phenol oxidase in shrimp and crab. **Food Res.**, v. 25, n. 5, p. 565-572, 1960.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MAPA nº 185, de 13 de Maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). **Diário Oficial [da] República Federativa da União**, Brasília, 19 maio de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa da União**, Brasília, 2 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa da União**, Brasília, 10 jan. 2001, seção1.

BRASIL/CÂMARA DOS DEPUTADOS. **Desenvolvimento sustentável da Aqüicultura no Nordeste Brasileiro**. Seminário Aqüicultura Continental no Nordeste Brasileiro. Brasília. Centro de Documentação e Informação, Câmara dos deputados. Série ação parlamentar n. 186, 2002, p. 183.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. SEAP, Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca. Balança comercial brasileira de pescados. Brasília: 2007. Disponível em: <http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/estatistica/> Acesso em: 5 de mar. 2007.

BRIGGS, M. S. F.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Ásia and the Pacific – **RAP PUBLICATION – FAO**, Bangkok, n. 10, p. 92, 2004.

CARVALHO, R.; GIORDANO, J. C.; FIGUEIREDO, M. J.; FONSECA, C. S.; PEREGRINO, L. H.; ALENCAR, R. Camarões marinhos gestão na qualidade e rastreabilidade na fazenda. Recife: 2005. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/download/Get%E3odeQualidade-Grande.pdf>> Acesso em: 5 de mar. 2007.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. Espana: Acribia, 1976, p. 333.

CINTRA, Israel Hidenburgo Aniceto. **Decomposição do óxido de trimetilamina relacionada com o uso de sulfitos em camarão**. Fortaleza, UFC, 1996. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca). Departamento de Engenharia de Pesca, 1996.

EHIRA, S. A biochemical study on the freshness of fish. **Bull Tokai Reg. Fish. Res. La.** Tokyo, v.88, p.1-32, 1976.

EVANGELISTA, Naíde Perna. **Determinação de Óxido de Trimetilamina (OTMA) e Trimetilamina (TMA) em Pescados**. Fortaleza, UFC, 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca). Departamento de Engenharia de Pesca, 1997.

FAULHABER, C. A importância de um sistema de inspeção e controle de qualidade dos produtos da pesca. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 21-26 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

FENNEMA, R. O. **Food Chemistry**. 2 ed. New York: Dekker, 1985, p. 991.

FINNE, G. T.; WAGNER, B. D.; WITT, R. M. Effect of treatment, ice storage and freezing on residual sulfite in shrimp. **J. Food Sci.** [S. I.], v. 51, n. 1, p. 1986.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 182.

GELLI, D. S. Análise microbiológica de pescado marinho. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 59-67 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

GÓES, M. N. B.; MENDES, P. P.; MENDES, C. M. F. R.; SILVA, R. P. P. e; Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*. **Acta Sci. Biol. Sci.** Maringá, v. 28, n. 2, p. 153-157, 2006.

GUZMÁN, E. C. Métodos químicos para análise de pescado. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 196-209 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

GUZMÁN, E. C. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. Jaboticabal: Funep, 1994, p. 409.

HEBARD, C. E., FLICK, G. J., MARTIN, R. E. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. **Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products**. AVI Publi., Westport, CT, p. 149-304, 1982.

HODGSON, L.; GREGG, K.; MCINTOSH, R. A Despesca Mecânica do Camarão. Recife: 2004. Disponível em: <<http://www.mcraquacultura.com.br/publicações/index.html>>. Acesso em: 16 mar. 2004.

HUSS, H. H. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. **Colección FAO: Pesca**. Rome, n. 29, 1988.

_____. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. **FAO documentos técnicos de pesca – T348**. Dinamarca, v. 7180/s, 1999, p. 202.

IYENGAR, J.R.; VISWESWARIAH, K.; MOORJANI, M. N.; BHATIA, D. S. Assessment of the Progressive Spoilage of Ice-stored Shrimp. **J. Fish. Res. Bd.** Canada, v.17, n. 4, p. 475-485, 1960.

JEYASEKARAN, G.; GANESAN, R.; ANANDARAJ, R.; SHAKILA, J.; SUKUMAR, D. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in ice. **Food Microbiology**. India, v. 23, p. 526-533, 2006.

KAI, M.; MORAIS, C. Vias de deterioração do pescado. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 13-20 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

KAMINISHI, Y.; NAKANIWA, K.; KUNIMOTO, M.; MIKI, H. Determination of K-value using freshness testing paper and freshness prediction on the finfishes stored at some different temperatures by the kinetic parameters. **Fisheries Science**. Japan, v. 66, p. 161-165, 2000.

KIETZMANN, U.; PRIEBE, K.; RAKOW, D.; REICHSTEIN, K. **Inspeccion Veterinaria de Pescados**. 1. ed. Espanha: Acribia, 1974, p. 326.

KIMURA, M.; SEKI, N.; KIMURA, I. Occurrence and some properties of trimethylamine – N – oxide demethylase in myofibrillar fraction from walleye Pollack muscle. **Fisheries Science**. Japan, v. 66, p. 725-729, 2000.

_____. TMAOase, trimethylamine – N – oxide demethylase, is a thermostable and active enzyme at 80°C. **Fisheries Science**. Japan, v. 69, p. 414-420, 2003.

KIMURA, M. TAKEUCHI, K.; KIMURA, I.; SEKI, N. The existence of aspolin and its trimethylamine – N – oxide demethylating activity in the muscle of freshwater fish. **Fisheries Science**. Japan, v. 71, p. 904-913, 2005.

KIRSCHNIK, P. G.; VIEGAS, E. M. M. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 19, n. 3, p. 407-412, 2004.

LEITÃO, M. F. F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial e marinha. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 40-58 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

LOSADA, V.; PIÑEIRO, C.; VELÁZQUEZ, J. B; AUBOURG, S. P. Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. **Food Chemistry**. Spain, v. 93, p. 619-625, 2005.

MADRID, R. M. A Crise Econômica da Carcinicultura. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro, p. 22-29, v. 15, n. 90, p. 22-29, 2005.

MAIA, E. P. Recentes Avanços da Carcinicultura Marinha Brasileira. [S. I.], mar., 2004. Disponível em: http://www.acaq.org.br/artigos/recentes_avancos_carnicultura_brasileira.doc. Data de acesso: 15 de jan. 2007.

MARCOS, A. L.; MAQUEDA, J. N. Aditivos Antimelanósicos Utilizados. **Guía de Buenas Prácticas para la Conservación de los Crustáceos**. Madrid: Centro de Publicaciones, 2003, p. 81-104.

MATSUMOTO, M.; YAMANAKA, H. Post-mortem Biochemical changes in the muscle of Kuruma Prawn during storage and evaluation of the freshness. **Nippon Suisan Gakkaishi**. Japan, v. 56, n. 7, p. 1145-1149, 1990.

MENDES, R.; QUINTA, R.; NUNES, M. L. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. **Eur Food Res Technol**. Lisboa, v. 212, p. 141-146, 2001.

MENESES, A. C. S.; OGAWA, M. Uso do bissulfito de sódio na prevenção da “mancha preta” em camarões, durante estocagem em gelo, e estimacão do dióxido de enxofre residual. **Arq. Ciênc. Mar.** Fortaleza, v. 10, n. 2, p. 89-93, 1977.

MISHIMA, T.; NONAKA, t.; OKAMOTO, A.; TSUCHIMOTO, M.; ISHIYA, T.; TACHIBANA, K.; TSUCHIMOTO, M. Influence of storage temperatures and killing procedures on post-mortem changes in the muscle of horse mackerel caught near Nagasaki Prefectura, Japan. **Fisheries Science.** Japan, v. 71, p. 187-194, 2005.

MORI, E. E. M. Análise sensorial de produtos de pescado no Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Controle de Qualidade do pescado.** Santos: Loyola, 1988, p. 81-105 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

NAGAOKA, J., TANAKA, K. **Reitoh-reizo-gaku.** Koseisha-Koseikaku, Tokyo, 1962, p. 458.

NORT, E. **Laboratório de Controle de Qualidade em Indústrias de Pescados.** Programa de Pesquisa e Desenvolvimento Pesqueiro do Brasil (PNUD/FAO – Ministério da Agricultura/SUDEPE), Rio de Janeiro, ed. III, série IV, 16p, 1973.

NORT, E. Importância do controle físico na qualidade do pescado. **Controle de Qualidade do pescado.** Santos: Loyola, 1988, p. 135-144 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

NUNES, A. J. P. O cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas. **Panorama da Aqüicultura.** Rio de Janeiro, v. 11, n. 66, p. 17-23, 2001.

OGAWA, M.; VIEIRA, G. H. F.; BASTOS, J. R.; NORONHA, M. C. C.; ALVES, M. I. M. Estudo sobre a conservação de caudas da lagosta *Panulirus argus* (Latreille). **Arq. Ciênc. Mar.** Fortaleza, v. 10, n. 2, p. 159-163, 1970.

OGAWA, M.; KUROTSU, T.; OCHIAI, I.; KOZIMA, T. T. Mechanism of black discoloration in spiny lobster tails stored in ice. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.** Japan, v. 49, n. 7, p. 1065-1075, 1983.

OGAWA, M.; PERDIGÃO, N. B.; SANTIAGO, M. E.; KOZIMA, T. T. On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.** Japan, v. 50, n. 10, p. 1763-1769, 1984.

OGAWA, M. Blackspot occurrence in lobsters and shrimp. **INFOFISH Marketing DIGEST.** [S.l.] n. 1/87, p. 43-44, 1987.

_____. Microrganismos do pescado. In: OGAWA, M., MAIA, E.L. (org) **Manual de Pesca: Processamento do pescado**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1999, p. 141-156.

OGAWA, M.; DINIZ, F. M. Tecnologia do Pescado na Região Nordeste. In: OGAWA, M., MAIA, E.L. (org) **Manual de Pesca: Processamento do pescado**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1999, p. 398-410.

OGAWA, N. B. P.; SILVA, F. C.; FILHO, C. J. S. Avaliação e controle de qualidade do pescado. In: OGAWA, M., MAIA, E.L. (org) **Manual de Pesca: Processamento do pescado**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1999, p. 175-187.

PERDIGÃO, N. B.; MENESES, A. C. S.; CARDONHA, A. M. S.; OGAWA, M. Estudo da barriga-preta em caudas de lagosta do gênero *panulirus white*. II – Incidência de barriga –preta e preservação de lagosta a bordo. **Arq. Ciên. Mar.** Fortaleza, v. 23, p. 51-56, 1984.

PONTES, C. P.; ARRUDA, M. F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustácea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. **Revista Brasileira de Zoologia**. [S.l.], v. 22, n. 3, p. 648-652, 2005.

RAHAMAN, M.; YASMIN, L.; KAMAL, M.; MAZID, M. A.; ISLAM NAZRUL, M. Effect of delayed icing on the quality changes in brackish water shrimp *Penaeus monodon* during ice storage. **Pakistan Journal of Biological Sciences. Bangladesh**, v. 4, n. 11, p. 1390-1394, 2001.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 455.

ROCHA, I. P. ABCC aponta crescimento da carcinicultura nacional. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, n. 323, p. 106-110, 2004.

RUIVO, U. E. A análise sensorial na avaliação da qualidade do pescado. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 69-80 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

SACCONI, A. J. P. Estocagem e transporte de pescado congelado. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 289-295 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

SAITO, T.; ARAI, K.; MATSUYOSHI, M. A new method for estimating the freshness of fish. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** Japão, v. 24, p. 749–750, 1956.

SHIRAI, T.; ONODERA, M.; SAITOH, S.; OGAWA, M.; CARVALHO, N. L. A.; SUZUKI, T.; HIRANO, T. Free Amino Acids, Creatina, ATP Related Compounds, Trimethylamine Oxide, and Inorganic Ions of the Muscle Extract of Fishes Caught in the Amazon River. **Fisheries Science**, Japão, v. 64, n. 4, p. 569-573, 1998.

SIKORSKI, Z. E. **Tecnologia de los productos del mar**. Espanha: Acribia, 1994, p. 330.

SILVA, A. I. M. et al. Qualidade microbiológica de camarão tipo exportação, processado – congelado em estabelecimentos no Estado do Ceará. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA – CONBEP, 13., 2003, Porto Seguro. Anais... Porto Seguro, 2003, [S.n.].

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, p. 295.

SILVA, R. S. Considerações sobre o uso e mau uso de sais de sulfitos em crustáceos. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 244-259 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

TAHA, P. Controle de qualidade do pescado exercido pela Weg Penha Pescados S.A. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p. 210-215 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

TAVARES, M.; AUED, S.; BACETTI, L. B.; ZAMBONI, C. Q. Métodos sensoriais, físicos e químicos para análise de pescado. **Controle de Qualidade do pescado**. Santos: Loyola, 1988, p.117-134 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

UCHIYAMA, H.; KOBAYASHI, H. – II – Suisan Shokuhingaku jikkensho. 3 – Gyoruiseisendo no column chromatography ni yoru Kanihantei, In: SAITO, T. et al. **Suisan Seibutsukagaku Shokuhin Jikkensho**. Koseisha – Koseikaku, Tokyo: [S.n.], 1974, p. 269-274.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Varela, 2004, p. 378.

WOYEWODA, A. D.; SHAW, S. J.; KE, P. J.; BURNS, B. G. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. **Canadian Tech. Rep. Fish. Aquatic Sci.** [S.I.], v. 1448, p. 143-189, 1986.

WURMANN, C. G.; MADRID, R. M. O desenvolvimento da salmonicultura no Chile. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 93, p. 14-23, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela: Valores das Análises microbiológicas na estocagem em gelo.

Estocagem (Dias)	Tratamento	Análises		
		Coliformes totais Log Col/g/37°C	Coliformes fecais Log Col/g/45°C	Contagem padrão de bactérias Log UFC/g
2	TM	4,66	2,32	4,07
	TAI	2,96	2,63	4,17
	TAII	2,96	2,63	4,25
	TAIII	2,63	Aus	4,30
	TAIV	2,32	Aus	3,77
	TC	1,38	0,55	4,60
4	TM	3,87	2,17	3,11
	TAI	1,38	2,17	3,84
	TAII	2,96	2,17	3,20
	TAIII	2,17	Aus	4,25
	TAIV	4,66	Aus	4,07
	TC	2,96	0,95	4,30
6	TM	2,63	2,17	3,07
	TAI	2,96	2,63	3,47
	TAII	1,38	2,17	3,14
	TAIII	2,96	0,55	4,47
	TAIV	2,63	Aus	4,07
	TC	2,17	0,95	4,77
8	TM	5,04	2,32	3,69
	TAI	4,66	2,17	5,07
	TAII	4,66	2,17	4,30
	TAIII	2,63	Aus	4,69
	TAIV	Aus	Aus	3,47
	TC	2,96	0,55	4,90
10	TM	2,96	Aus	3,20
	TAI	2,63	Aus	3,25
	TAII	2,69	Aus	3,07
	TAIII	2,63	0,55	3,07
	TAIV	2,17	Aus	1,0
	TC	2,96	0,95	4,17
12	TM	4,66	Aus	3,11
	TAI	5,04	Aus	3,07
	TAII	2,96	Aus	1,0
	TAIII	2,17	Aus	1,0
	TAIV	1,86	Aus	1,0
	TC	2,63	0,55	3,47
14	TM	1,36	0,55	3,11
	TAI	2,96	Aus	1,0
	TAII	0,95	Aus	1,0
	TAIII	2,17	Aus	1,0
	TAIV	1,86	Aus	1,0
	TC	2,63	0,55	3,47
16	TM	2,38	0,55	3,25
	TAI	5,04	0,55	1,0
	TAII	0,38	0,55	1,0
	TAIII	Aus	Aus	1,0
	TAIV	Aus	Aus	1,0
	TC	1,86	Aus	3,07
18	TM	4,66	0,95	3,39
	TAI	4,66	0,95	1,0
	TAII	3,87	Aus	1,0
	TAIII	Aus	Aus	1,0
	TAIV	Aus	Aus	1,0
	TC	1,86	Aus	3,07
20	TM	1,38	2,32	3,20
	TAI	2,38	0,95	1,0
	TAII	2,96	Aus	1,0
	TAIII	Aus	Au	4,84
	TAIV	2,17	Aus	4,69
	TC	1,86	Aus	5,17
22	TM	4,66	0,95	1,0
	TAI	2,96	2,17	1,0
	TAII	3,38	1,86	1,0
	TAIII	1,86	Aus	4,84
	TAIV	Aus	Aus	4,69
	TC	2,17	Aus	5,17

ANEXO 2

Valor de K

Reagentes:

- 1- PCA 10%- 500ml
- 2- PCA 5%- 500ml
Obs.:1 e 2 em vidro âmbar e mantidos a 5°C
- 3- KOH 10N – 1L
- 4- PCA 6 % neutro – 1L
- 5- Ajustar o pH para 6,5 com KOH 10 N (mais ou menos 20 gotas) até pH 3 e continuar com KOH 1N até pH 6,5 - 6,8 (mais ou menos 10 gotas).

Preparação da Resina:

1. 50g de resina Dowex 1 x 4 Cl⁻
2. Lavar (1) com 300ml de acetona. Repousar por 25 minutos;
3. Filtrar para retirar a acetona usando um funil de Büchner;
4. Lavar a resina com 300ml de água bidestilada;
5. Passar a resina para um Becker de 1000ml;
6. Adicionar 600ml de NaOH 1N, mexer e deixar repousar por 40 minutos;
7. Filtrar com funil de Büchner;
8. Lavar a resina com 300ml de água bidestilada
9. Passar a resina para um Becker de 1000ml;
10. Adicionar 600ml de água bidestilada a mexer e mexer e repousar por 6 minutos. Filtrar e desprezar o sobrenadante;
11. Repetir até ficar neutro;
12. Adicionar 600ml HCl 1N. Repousar por 40 minutos;
13. Filtrar com funil de Büchner;
14. Lavar com água bidestilada até água que passe fique com pH neutro;
15. Manter a resina com água bidestilada em geladeira.

Preparo de soluções eluentes:

- Solução A: HCl 0,001N (HCl a 37%, d = 1,19, retirar 0,083ml e completar para 1L com água bidestilada)
- Solução B: NaCl 0,6 M contendo HCl 0,01N (pesar 35,06g de NaCl e medir 0,83ml de HCl, dissolver e completar para 1L com água bidestilada)
- Amônia líquida 0,5 M para ajustar o pH do extrato neutralizado para pH 9,4

Solução A- para extração de Hx e HxR

Solução B- para extração ATP, ADP, AMP e IMP

Preparação do extrato:

Obs.: Todo material usado deve ser resfriado.

1. 1g de músculo, homogeneizado em temperatura fria, em um tubo de centrifuga de 10ml com 2ml de PCA a 10%;
2. Centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos;
3. Decantar o sobrenadante em um Becker de 30ml e o resíduo é lavado com 2ml de PCA a 5% e recentrifugar. Esta operação é repetida 2 vezes. Os sobrenadantes são juntados em um Becker de 30ml;
4. Neutralizar o extrato com KOH 10N usando 20 a 23 gotas até pH 3. Continuar com KOH 1N com 8 – 10 gotas até pH 6,5 – 6,8
5. Centrifugar o extrato neutro. Passar o sobrenadante para um balão volumétrico de 10ml. O precipitado de perclorato de potássio é lavado com 2ml de PCA 5% neutro. Esta operação é repetida mais uma vez usando somente 1,5ml de PCA neutro. Os extratos devem ser mantidos a 5°C.

Preparação da coluna:

1. A resina lavada é colocada na coluna até uma altura de 5cm. É derramada lentamente pelas paredes da coluna para evitar bolhas de ar entre as partículas de resina;
2. Se a coluna não for usada logo, é conveniente estocá-la em um refrigerador a 5°C após seu topo e extremidade serem vedadas com parafina ou bolhas de borracha.

Processo de separação de HxR e Hx

1. Colocar 2ml do extrato neutralizado em um Becker de 20ml e ajustar o pH para 9,8 com algumas gotas de amônia líquida 0,5M;
2. Colocar na coluna já preparada. Lavar o Becker com mais ou menos 2ml de água deionizada ajustada para pH 9,4. Lavar também a coluna;
3. Conectar o funil de separação na coluna quando o menisco da solução amostra estiver chegando no topo da resina. Despejar 20ml de água deionizada;
4. Colocar 45ml de solução A no funil de separação, gotejando continuamente para a coluna (1ml/min). Recolher em um balão de 50ml.
5. Quando o menisco da solução A estiver no topo da resina, colocar 45ml da solução B no funil de separação;
6. Operar do mesmo modo que a anterior, usando outro balão de 50ml;
7. Os eluídos A e B recolhidos são completados para 50ml com as respectivas soluções A e B.

*Recuperação da resina:

1. lavar a resina com 200 a 300ml de solução B;
2. Lavar com água destilada até ficar com o mesmo pH da água.

Cálculos:

O valor de K pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$K = (E_{250\text{nm}} A / E_{250\text{nm}} A + E_{250\text{nm}} B) \times 100 (\%)$$

onde, $E_{250\text{nm}} A$ e $E_{250\text{nm}} B$ são as densidades óticas a 250 nm das frações da solução A e B, respectivamente.

ANEXO 3

Método de Dyer -TMA

Fonte: Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality

A.D. Woyeoda, S.J. Shaw, P.J. Ke & B.G. Burns.

Aplicação: O método do ácido pícrico é aplicável a todas as espécies marinhas contendo o precursor OTMA para estimação da deterioração bacteriana. Entretanto, a correlação da TMA com a qualidade organoléptica irá variar com espécie, estação do ano e estoque. Quando a amostra for estocada congelada por períodos extensos, o procedimento simultâneo TMA/ DMA deverá ser aplicado para excluir a interferência da DMA.

Princípio: O extrato de TCA obtido do peixe reage com ácido pícrico para produzir um picrato altamente colorido. Formaldeído é adicionado nas análises para fixar a amônia e monometilaminas presentes e somente a TMA ser extraída com tolueno. Adição de um álcali (KOH 25%) facilita a extração da amina para a fase de tolueno com subsequente formação de picrato. Através da medida da absorvância a 410nm, a TMA pode ser quantificada.

Precauções:

1. Uma adequada agitação/rotação é importante: Desvio no procedimento pode alterar a curva padrão;
2. A temperatura durante a mistura e agitação das soluções do extrato de TCA, formaldeído, álcali, e tolueno deverá ser mantida a 30° C para proporcionar reprodutibilidade. Um banho-maria nessa temperatura deverá estar disponível;
3. Secar somente uma pequena quantidade de ácido pícrico por uso. O ácido pícrico poderá explodir se sujeito a choque ou calor quando no estado seco;
4. Secar tolueno com Na₂SO₄;

5. O reagente ácido pícrico deverá ser adicionado em tubos de ensaio limpos e secos uma vez que o método é sensível a água e outros contaminantes;
6. Se a amostra tiver sido estocada por períodos longos ou temperatura aceleradora da produção de DMA, o procedimento simultâneo DMA/TMA deverá ser aplicado para compensar a interferência da DMA;
7. Manter as amostras resfriadas para minimizar posterior produção de TMA;
8. Extratos de TCA são estáveis em estocagem congelada;
9. Se ácido perclórico (6%) é usado para extração, os extratos devem ser cuidadosamente neutralizados para pH 6,8 exatamente na hora de usar. Tomar cuidado no uso de ácido perclórico.

Reagentes:

- a) Formalina 10%- preparar 500ml e neutralizar com $MgCO_3$. Filtrar em papel filtro. PH final: 7,0-8,0;
- b) Tolueno- desidratar com Na_2SO_4 ;
- c) KOH 25%-500ml;
- d) Ácido pícrico 0,02% em tolueno desidratado. Prepara-se uma solução estoque de ácido picrico 2% em tolueno desidratado e deixa em geladeira. Diluir para 0,02% na hora da análise.
- e) Cloridrato de trimetilamina (TMA-HCl).

Preparação do extrato:

- 1) Homogeneizar 50 g de amostra com 100ml de TCA 7,5% (extração 1:2);
- 2) Centrifugar a 4°C por 15 minutos a 2000G (4000rpm) ou deixar decantar e filtrar através de papel de filtro Whatman # 4.

Solução padrão de TMA

- 1) Recristalizar TMA_HCl 2 vezes com álcool etílico e dessecar a vácuo.
- 2) Pesar 0,682g;
- 3) Adicionar 1ml de HCl concentrado;
- 4) Completar o volume para 100ml de água destilada;
- 5) 1ml desta solução (4) contém 1mg de N-TMA;
- 6) Retirar 1ml de (5), adicionar 1ml de HCl concentrado. Completar o volume para 100ml com água destilada.
1ml desta solução = 10y N-TMA

Curva padrão de TMA

Procedimento

- 1)Retirar alíquotas de 0,1 a 4 ml de extrato para um funil de separação;
- 2)Completar o volume para 4ml de água destilada;
- 3)Adicionar 1ml de formaldeído, 10ml de tolueno desidratado e 3ml de KOH a 25% e misturar;
- 4)Repousar por 10 minutos a 30°C;
- 5)Agitar bem por 1 minuto;
- 6)Deixar em repouso para separação das camadas (mais ou menos 5 minutos ao ambiente);
- 7)Retirar a camada superior (tolueno) para um tubo de ensaio contendo Na₂SO₄ anidro e agitar bem;
- 8)Pipetar 5ml de (9) para um tubo de ensaio seco e adicionar 5ml de ácido pícrico 0,02% e misturar agitando-se os tubos;
- 9)Ler a absorbância a 410nm.

Branco: Usar 4ml de TCA 4% em substituição à amostra.

Determinação de N-TMA pelo método de Dyer (do livro Marine Products – Japão)

O método de Dyer foi modificado por Shewan *et al.* (1969) e está descrito abaixo.

Formaldeído é adicionado ao extrato do músculo em TCA para fixar alguma amônia presente, e o TMA na solução amostra é extraído com tolueno. Uma cor amarela é desenvolvida pela reação da TMA com o ácido pícrico e o TMA sendo determinado colorimetricamente. Dyer *et al.* empregaram bicarbonato de potássio como agente alcalino que foi usado para liberar TMA do extrato. Shewan *et al.*, entretanto, indicam o uso de hidróxido de potássio 45% como agente alcalino. O objetivo dessa modificação foi de eliminar o efeito da DMA que ocorre no músculo de peixe. De acordo com eles, hidróxido de potássio deu melhor concordância com o método de Conway de acordo também com Hashimoto *et al.* (1957). O uso de hidróxido de potássio a 45% apresentou resultados superiores àqueles obtidos por Hashimoto *et al.* (1957) que usaram hidróxido de potássio 25%.

Reagentes

Os seguintes reagentes são usados: formaldeído 10%, tolueno, hidróxido de potássio 45%, solução de ácido pícrico em tolueno 0,02% e sulfato de sódio anidro.

Procedimento

Pipetar 5 mL do extrato do músculo em TCA em um funil de separação e 1 mL de formaldeído 10%, 10 mL de tolueno, e 3 mL de hidróxido de potássio a 45% são adicionados ao extrato nessa ordem. A mistura é vigorosamente agitada manualmente 60 vezes. Deixar um tempo em repouso para permitir a completa separação das fases de tolueno e aquosa. Tomar aproximadamente 7 mL da fase de tolueno, camada superior, para um tubo de ensaio e adicionar um pouco (~1g) de sulfato de sódio anidro, e agitar. Um volume de 5 mL da fase de tolueno assim tratada é transferido para outro tubo de ensaio e adicionado 5 mL da solução de ácido pícrico e a subsequente cor desenvolvida é estimada colorimetricamente. A densidade ótica é medida a 410 nm relativa

ao branco ao qual TCA 5% foi adicionado ao invés do extrato. Antes da análise das amostras, uma curva padrão de calibração deve ser construída. O conteúdo de TMA na amostra é calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$\text{TMA} = (X - b) \cdot K \text{ (mg\%)}$$

Onde X é a densidade ótica da solução amostra a 410 nm; K, uma constante, a quantidade de TMA por unidade de densidade ótica que foi obtida da curva padrão.

ANEXO 4

Bases voláteis totais - BVT

Princípio:

O nitrogênio protéico é precipitado com ácido tricloroacético (TCA). O filtrado contendo o N volátil é alcalinizado e as bases voláteis, inclusive a trimetilamina, são destiladas por arraste de vapor, recebidas em solução de ácido bórico e titulada com ácido padronizado.

Material:

- Balança de precisão;
- Becker de 250mL;
- Liquidificador ou homogeneizador;
- Funil e erlenmeyer de 125mL;
- Papel de filtro resistente a ácidos;
- Proveta de 500mL e buretas de 25 ou 10mL;
- Pipetas graduadas de 10mL e volumétricas de 10mL;
- Destilador de nitrogênio (microkjeldahl);

Reagentes:

- Solução de ácido tricloroacético a 5%;
- Solução de ácido bórico a 4%;
- Solução de ácido clorídrico 0,01N padronizado;
- Óxido de magnésio;
- Indicador misto (Pesar 0,2g de vermelho de metila e 0,1g de verde de bromocresol. Dissolver em 200mL de álcool a 70%. Filtrar, se necessário e guardar em frasco escuro.)
- Solução de formaldeído a ~ 35%, neutralizado. (a neutralização é feita com solução de NaOH 0,1N usando fenolftaleína como indicador.)

Preparação da amostra:

- Pesar 100g de amostra e triturar em liquidificador com 300mL de sol. De ac. Tricloroacético a 5%, durante 1 min. até obter uma massa bem homogênea.
- Filtrar com papel de filtro qualitativo (filtração rápida). Caso o filtrado não esteja límpido, deve-se filtrar outra vez. Pode também usar centrifugação para se obter um estrato límpido.

Procedimento:

- Transferir 10mL do filtrado acima, com pipeta volumétrica para o balão ou tubo do aparelho de destilação, por arraste de vapor;
- Adicionar 2g de óxido de magnésio e 20mL de água destilada;
- Proceder a destilação por arraste de vapor por 10 min ou até que o destilado não dê reação alcalina com papel indicador;
- Recolher o destilado em erlenmeyer de 125mL contendo 20mL de solução de ácido ascórbico com 2 gotas do indicador misto;
- Titular com a amônia e aminas voláteis destiladas com uma solução de ácido clorídrico 0,01 N usando uma microbureta;

Cálculo:

$$N\text{-BVT (mg/100g)} = 14 \times (300+A) \times V \times F / V_a \times P$$

V= volume do ácido clorídrico 0,01N gastos na titulação

F= fator da solução do ácido clorídrico

V_a= volume da alíquota

P= peso inicial da amostra

A= conteúdo de água da amostra expressa como mg/100g

Obs: Na maioria dos casos pode-se afirmar que o conteúdo de água no músculo do pescado é de 80%. A expressão (300+A) torna-se 380 quando são utilizadas exatamente 100g de pescado. Pode-se usar também 50g de amostra e homogeneizar com 150mL de ácido tricloroacético. Neste caso a expressão torna-se (150+40).

REFERÊNCIA: Seminário de Controle de Qualidade de Produtos Pesqueiros. Santos - SP: Ed. Loyola, 1988.

ANEXO – 5**Análises microbiológicas****Preparo da amostra para exame microbiológico****Material**

- 1.1 Capela de fluxo laminar ou câmara asséptica;
- 1.2 Balança semi-analítica;
- 1.3 Copos homogeneizados padronizados, esterilizados, acopláveis em liquidificador comum, capacidade de 400 a 500mL;
- 1.4 Bisturis, facas com lâmina e cabo de aço inox, espátulas, pinças, colheres, abridores de lata com cabo longo e tesoura esterilizada;
- 1.5 Bandejas de alumínio ou aço inox desinfetadas;
- 1.6 Caneta para retroprojeção ou lápis demográfico;

- 1.7 Cuba com desinfetante para o descarte do material utilizado;
- 1.8 Frasco autoclavável contendo 225mL de solução salina peptonada estéril a 0,1%;
- 1.9 Solução desinfetante (formol a 5%, fenol 3%, álcool iodado, cloro a 50ppm).

Procedimento

- 1.10 Desinfetar a superfície das embalagens que estão em contato direto com o produto;
- 1.11 Abrir as embalagens desinfetadas dentro da capela de fluxo laminar ou câmara asséptica tomando as seguintes precauções:
 - 1.11.1 Fazer inspeção visual do produto, observando odores anormais;
 - 1.11.2 Retirar as alíquotas para análises caso o produto não apresente sinais visíveis de alteração;
 - 1.11.3 Se o produto apresentar sinais visíveis de alterações só fazer a análise se for necessário elucidar a ocorrência de toxi-infecção alimentar de origem microbiana;
 - 1.11.4 Evitar que o produto entre em contato com a superfície externa da embalagem ou com superfícies não estéreis.
- 1.12 Pesar 25g da amostra dentro dos copos homogeneizados, tomando as seguintes precauções:
 - 1.12.1 Só abrir os copos dentro da capela ou câmara asséptica;
 - 1.12.2 Adicionar 225mL de solução salina peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1});
 - 1.12.3 Fechar os copos quando for retirá-los da capela ou câmara asséptica;
- 1.13 Acoplar ao liquidificador e homogeneizar cerca de 2 minutos;
- 1.14 Se necessário, transferir o conteúdo do copo para os frascos originais de solução salina peptonada, dentro da câmara asséptica e programar as diluições subseqüentes e a sua semeadura, no prazo médio de 10 a 15 minutos, registrando o tempo decorrido.

Observações

- 1.15 Depois de aberta a embalagem e retiradas as alíquotas para os exames de microbiologia, encaminhar imediatamente o restante para os exames de microscopia, físico-química e organolépticos.
- 1.15.1 Caso seja necessário conservar a amostra, respeitar as condições de armazenagem do produto.

Contagem padrão em placas (mesófilos)

Material

- 1.1. Estufa bacteriológica regulada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$;
- 1.2. Contador de colônias com fundo escuro;
- 1.3. Placas de Petri estéreis;
- 1.4. Pipetas bacteriológicas de 1,0mL com graduação decimal;
- 1.5. Agar Padrão para Contagem, estéril;
- 1.6. Tubos contendo 9mL de solução salina peptonada a 0,1%.

Procedimento

- 1.7. Preparar as diluições necessárias 10^{-2} e 10^{-3} , a partir da diluição 10^{-1} , da amostra preparada anteriormente, transferindo 1 mL da diluição para tubos com 9mL de solução salina peptonada e homogeneizar;
 - 2.1.1. Homogeneizar:
 - 2.1.1.1. A diluição 10^{-1} deve ser resuspensa no liquidificador, por 15 segundos antes de ser feita a diluição 10^{-2} e a semeadura;
 - 2.1.1.2. Para fazer as diluições subseqüentes e as semeaduras, resuspender por 10 segundos em agitador. Na ausência do agitador aspirar e soltar a suspensão 15 vezes com a pipeta.
 - 2.2. Distribuir 1mL de cada diluição no centro de placas de Petri estéreis adicionando-se cerca de 15mL de Agar Padrão para contagem fundido e resfriado a 45°C . Em superfície plana, submeter a placa a duas séries

alternadas de cinco movimentos de vai-vem e cinco movimentos rotatórios.

Deixar solidificar;

2.3. Incubar as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas;

OBS: Recomenda-se para amostras de produtos com expectativa de problemas, e em repetições necessárias, que a contagem padrão em placas seja efetuada com utilização de placas em duplicata, nas várias diluições.

Obtenção dos resultados

2.4. Serão considerados significativas as contagens das diluições que apresentarem entre 30 e 300 colônias;

2.5. Para calcular o número de Unidade Formadora de Colônia (UFC) por grama do produto, multiplicar o número significativo encontrado, pelo fator de diluição correspondente;

2.6. Leitura abaixo de 30 colônias na menor diluição (10^{-1}), expressar como abaixo de 300 UFC/grama;

2.7. Ausência de crescimento em 10^{-1} , expressar como abaixo de 10 UFC/grama;

2.8. Leitura acima de 300 colônias na maior diluição expressa como maior que 300×10 UFC/grama;

2.9. Leitura entre 30 e 300 colônias, expressar o resultado multiplicando-se o valor encontrado, pelo fator de diluição correspondente.

OBS: Para contagens em duplicata, na obtenção dos resultados, utilizar a média das contagens nas placas que apresentam entre 30 e 300 colônias.

Exemplo de expressão dos resultados

Número de colônias encontradas na diluição de 10^{-3} :250.

Resultado: $2,5 \times 10$ UFC/grama.

Observação:

O procedimento para a pesquisa de termófilos e psicrotrófilos é o mesmo descrito para mesófilos, variando a tempo e a temperatura de incubação:

a) Psicrotrófilos.....2 a 8°C /10 dias.

- b) Termófilos.....55 a 1°C/48 horas.

Contagem de bactérias do grupo coliformes pelo método de NMP

Material

- 1.1. Estufa bacteriológica regulada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$;
- 1.2. Alça de 3 mm de diâmetro de platina ou níquel-cromo nº25 em cabo de Kolle;
- 1.3. Tubos de ensaio contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST); com tubo de Durhan invertido;
- 1.4. Pipetas bacteriológicas de 1,0 mL com graduação decimal;
- 1.5. Tubos contendo caldo Lactosado Bile Verde Brilhante a 21 com tubo de Durhan invertido;
- 1.6. Tubos contendo 9 mL de solução salina peptonada a 0,1%.

Procedimento

a) Teste presuntivo

- 2.1. Preparar as diluições decimais seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} com solução salina peptonada a 0,1%;
- 2.2. Semear, respectivamente, em cada série de 3 tubos de LST 1,0 mL de cada diluição da amostra;
- 2.3. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}/48$ horas e separar os tubos positivos (presença de gás nos tubos de fermentação de Durhan). Em caso da bactéria apresentar todos os tubos positivos em 24 horas proceder ao teste confirmativo.

b) Teste confirmativo

- 2.4. A partir de cada tubo positivo no teste presuntivo, inocular, com a alça, em tubos com caldo Lactosado Bile Verde Brilhante a 2%.
- 2.5. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}/48$ horas. Caso a bactéria apresentar todos os tubos positivos em 24 horas proceder à leitura;

2.6. Após incubação proceder à leitura e separar os tubos positivos pela presença de gás nos tubos de Durhan;

2.7. Calcular o NMP de coliformes totais, através do número de tubos positivos, consultando a tabela específica, e expressar o resultado em NMP de bactérias do grupo coliformes por grama.

Exemplo

Número de tubos positivos no teste confirmativo:

Diluição $10^{-1}=2$

Diluição $10^{-2}=1$

Diluição $10^{-1}=0$

Consultando a tabela da página, encontramos para esta combinação o NMP igual a 15.

Expressão dos resultados

Contagem de bactérias do grupo coliforme (NMP/g)=15

Observação: em caso de uma combinação de número de tubos positivos nas três séries de diluições não encontradas na tabela de NMP, a contagem deve ser repetida.

OBS: Procedimento para contagem de coliformes fecais

Procedimento:

1. A partir dos tubos positivos para coliformes totais em meio de LST, transferir uma alça carregada para tubos de caldo EC;
2. Incubar a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}/24$ horas;
3. Após a incubação, realizar a leitura dos tubos.