

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE RIO GRANDE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE ÍNDICES DE QUALIDADE PARA
FILES DE PEIXE CONSERVADOS EM GELO E CONGELADOS

José Antonio Guimarães Aleixo

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Yokoya

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Área de Pescado.

- 1977 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, Dorinha, Sabina e Marina.

ÍNDICE

| | página |
|---------------------------------|--------|
| RESUMO..... | i |
| SUMMARY..... | iii |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 22 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |
| FIGURAS..... | 39 |
| TABELAS..... | 47 |
| ANEXOS..... | 49 |
| AGRADECIMENTOS..... | 53 |

RESUMO

Estudou-se a influência do tempo de conservação em gelo, congelação e posterior armazenagem em alguns parâmetros de qualidade da pescada foguete (Macrodon ancylodon). Após a avaliação sensorial do grau de deterioração da matéria prima através do sistema recomendado pela Torry Research Station, procedeu-se o fileteamento e embalagem dos filês em folhas de papel alumínio e fez-se o controle da concentração de hipoxantina e do número total de bactérias por grama de músculo. A congelação dos filês foi feita através de dois métodos: em placas a -40° C e em ambiente com ar em repouso a -22° C. Em seguida à congelação e depois de uma, quatro e oito semanas de armazenamento a -22° C, foram repetidas as determinações.

Os resultados obtidos na avaliação sensorial permitiram verificar que o peixe ao ser desembarcado já sofreu considerável perda em sua qualidade, mantendo-se aceitável para consumo *in natura* até o quinto dia de conservação em gelo quando a soma de seus atributos sensoriais atingia cerca de 15 pontos. Em se tratando de peixes para obtenção de filês para congelação, achou-se recomendável utilizar apenas os que conseguiam obter 20 ou mais pontos na avaliação sensorial.

Os resultados da determinação da hipoxantina no peixe mantido em gelo por sete dias mostraram um aumento gradativo na sua concentração com valores entre 0,09 e 0,27 mg/g de músculo, o que indica a possibilidade de uso do teste como uma medida do tempo de armazenagem em gelo para esta espécie. Quando se comparou estas concentrações com a soma dos pontos obtidos na avaliação sensorial, encontrou-se uma relação coerente, ou seja, na faixa de aceitabilidade (25 a 15 pontos) tivemos valores entre 0,09 e 0,18 mg/g e na faixa onde começa a haver rejeição (menos de 15 pontos) estes valores situaram-se de 0,19 mg/g para cima.

A mesma determinação realizada nos filês após os dois métodos de congelação e durante o armazenamento a -22° C, mostrou que não houve variações significativas na concentração de hipoxantina.

Estes resultados indicam que é possível aplicar o teste, nesta espécie, como um índice de sua qualidade antes da congelação nas condições já descritas.

As contagens totais, realizadas nos filês obtidos sob boas práticas de elaboração, mostraram um aumento a medida que a matéria prima diminuía de qualidade; quando o peixe utilizado para a filetagem obtinha entre 20 e 21 pontos na avaliação sensorial o número de bactérias no produto final situava-se em torno de 10^6 /g.

As porcentagens de bactérias sobreviventes aos dois métodos de congelação foram similares; 42% no método de placas e 38% no que utiliza ar em repouso. Durante a armazenagem dos filês congelados em placas esta porcentagem decresceu a 19,7% na primeira semana, 11,5% na quarta e 9% na oitava; nos congelados em ar em repouso ficou em 23% na primeira semana, 15% na quarta e 11% na oitava. Estes resultados permitiram tecer considerações relativas ao emprego das contagens totais para avaliar a qualidade dos filês congelados.

SUMMARY

The effect of storage in ice, freezing and further storage on quality characteristics of freshness of pescada foguete (Macrodon ancylodon) was carried out. The quality of raw fish was established basing upon sensory evaluation index proposed by Torry Research Station. For freezing experiment, the fish was previously fileted and wrapped in an aluminium foil and frozen by two methods: quick freezing with direct surface contact at -40° C, and slow freezing with still air at -22° C. The quality of product was controlled by two methods: total plate count and content of hypoxanthine.

The results of sensory evaluation indicated that the fish was acceptable until the fifth day of storage in ice when the sum of points became about 15 points. For processing purposes it was recommended that they should not be used if the sum of points was below 20.

The content of hypoxanthine in muscle increased gradually from 0.09 to 0.27 mg/g during the storage in ice, indicating that it can be used for evaluation of its freshness. Product with 25 to 15 points in sensory evaluation gave 0.09 to 0.18 mg/g of hypoxanthine content.

After freezing, there was no detectable change in hypoxanthine content, whichever method was used. Also there was no change in its content during the storage at -22° C. These results indicated that the method is quite adequate for evaluating freshness of fish used for preparation of frozen filets.

The microbial counts of raw fish increased as freshness quality of fish reduced. Usually, in sample which received 20 to 21 points on sensorial evaluation, the microbial counts of final product was about 10^6 /g. The survival of microbes during freezing operation was 42% and 38% respectively for quick and slow freezing. Gradual decrease in microbial load was observed during storage at -22° C reaching 9 to 11% of inicial count after eight weeks of storage. These results indicated that the microbial count could also be used for evaluating quality of fileted fish.

INTRODUÇÃO

As inovações técnicas na produção, processamento, preservação, transporte e comercialização dos alimentos, bem como o constante aumento da população mundial, tiveram como resultado um nível sem precedentes no número, classes e quantidade de produtos alimentícios comercializados tanto a nível nacional como internacional. Enquanto desenvolveram-se medidas governamentais baseadas em taxações à importações e incentivos à exportações no sentido de proteger produtos e indústrias de alimentos, as normas e padrões de identidade e qualidade dos alimentos, destinadas à proteção da saúde dos consumidores e à prevenção de fraudes, cresceram desordenadamente e com frequência parecendo carecer de base racional.

As distintas circunstâncias, as tradições e os gostos, traduziram-se em uma grande diversidade de normas em todo o mundo. Com o incremento do comércio de alimentos se verificou que essa diversidade passou a se constituir em um verdadeiro entrave à realização dos negócios. As tentativas iniciais de harmonização das normas para alguns países europeus conduziram em 1962 ao estabelecimento de um Programa Conjunto Sobre Normas de Alimentos entre a Organização para Alimentos e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), ambos órgãos das Nações Unidas, cuja principal tarefa é a elaboração do "Codex Alimentarius", uma compilação de normas e padrões para alimentos internacionalmente aceitas. Os objetivos do Codex são os de proteger a saúde humana e assegurar o cumprimento de práticas adequadas no comércio de alimentos.

Por outro lado, embora o grande esforço para harmonização das normas no plano internacional, muito ainda permanece por ser feito na maioria dos países. No Brasil, foi criada em 1967 a Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos (CNNPA), órgão do Ministério da Saúde, a quem compete fixar os padrões de identidade e qualidade de nossos alimentos e estabelecer normas tendentes à unificação das técnicas de análise.

Em que pese os dez anos já decorridos desde a criação da CNNPA e a sua importância para a defesa dos interesses dos consumidores e para a conquista de mercados externos, pode-se afirmar que é pequeno ainda o número de alimentos padronizados devido, principalmente, a carência de informações acerca de sua composição e seus fatores essenciais de qualidade e, também, sobre o nível de sua contaminação tanto *in natura* como após industrialização. Acreditamos que esta situação se inverta na medida que nossas instituições de pesquisas sobre alimentos orientem uma parte de suas atividades no sentido de fazer estas determinações.

O estudo de padrões de identidade e qualidade para alimentos interessa, portanto, aos consumidores e suas associações, aos serviços de saúde pública e a indústria e comércio do setor. Este interesse justifica a realização de trabalhos sobre o assunto.

O presente estudo visará analisar alguns métodos aplicados, ou potencialmente aplicáveis, na avaliação da qualidade de filés de pescada fogueite (Macrodon ancylodon). Os métodos foram comparados aos resultados da avaliação sensorial sempre que possível. Uma atenção especial foi dada quanto a verificação de alteração na validade dos métodos pela aplicação de processos tecnológicos, como a congelação e o armazenamento do produto posterior à congelação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A) Desenvolvimento de padrões microbiológicos para alimentos *

Os padrões microbiológicos foram propostos porque notou-se a relação entre certos alimentos e o aparecimento de doenças e, também, porque as novas técnicas de processamento e preparo resultam em mudanças na flora microbiana normal de um alimento tornando-o um risco em potencial à saúde (2).

A lógica da colocação de padrões microbiológicos nos alimentos reside no fato de que quanto menor for o número total de bactérias presentes, menor será a probabilidade que qualquer destas bactérias seja prejudicial à saúde (42).

De uma maneira geral, a padronização dos alimentos do ponto de vista microbiológico tem os seguintes propósitos (17, 55, 60, 21): (a) assegurar que o alimento seja absolutamente livre de toxinas e germes patogênicos de significância em saúde pública; (b) assegurar que o alimento tenha sido preparado a partir de matéria prima de boa qualidade e que tenha sofrido manipulação adequada; (c) fornecer uma expectativa quanto a perecibilidade do alimento durante a estocagem.

Para Thatcher (66) o quadro bacteriológico adequadamente retratado mostra o efeito significativo das más condições sanitárias, devendo ser o indicador preferido da situação higiênica da indústria de alimentos. Existem padrões bacteriológicos quantitativos como o número total de bactérias aeróbias ou o número de bactérias indicadoras permitidas em determinado alimento, admitindo-se nestes casos que juntamente com as não patogênicas possam existir, ainda que em pequeno número, tipos patogênicos como Staphylococcus coagulase positivo, Clostridium perfringens, Bacillus cereus. Existem, também, padrões qualitativos baseados na ausência de, ou na incapacidade de técnicas padrões determinarem qualitativamente, Salmonella, enterotoxina estafilocócica ou toxina botulínica (42).

* Referimo-nos à toda substância destinada ao fornecimento de elementos para a formação, manutenção e desenvolvimento do organismo humano, seja in natura ou após ter sido submetida à processo tecnológico adequado.

Os padrões bacteriológicos tem a vantagem de colocar as questões de segurança quanto à presença de patógenos e qualidade higiênica em uma base numérica (21), quanto maior for sua objetividade mais úteis eles serão (60). Segundo Ingram (31), é difícil estabelecer o nível bacteriano que expresse a real situação de um alimento. Já que análises repetidas geralmente não coincidem, principalmente se houver decorrido algum tempo entre elas. A carência de uniformidade e confiança nos resultados das análises são as razões pelas quais Yeterian e colaboradores (70) acham muito difícil de se estabelecer um nível microbiológico fixo que determine se um alimento é aceitável ou não, embora reconheçam que as especificações bacteriológicas provaram ser válidas para avaliação de boas práticas de elaboração dos produtos alimentícios.

De acordo com Shiffman e Kronick (60), sendo o principal propósito dos padrões microbiológicos fornecer informações relativas às condições sanitárias, práticas e processos na planta, o seu estabelecimento deveria ser precedido pelo desenvolvimento de códigos de práticas sanitárias. O padrão seria baseado nas contagens de microrganismos obtidos quando as práticas sanitárias recomendadas no código fossem seguidas. Segundo os mesmos autores, as agências oficiais de controle de alimentos que combinam serviços de inspeção na planta com análises de laboratório poderiam contribuir muito para se chegar a padrões objetivos.

Para Corlett (15) toda a indústria de alimentos dever ter um programa de controle bacteriológico que estabeleça limites em três partes básicas da elaboração de um produto: na matéria prima e demais ingredientes, nas diversas etapas do processamento e no produto final. O uso de limites bacteriológicos apenas para o produto final introduz o risco de sua rejeição por causas indeterminadas.

Os padrões microbiológicos são úteis quando não são conhecidas as condições de elaboração de um produto alimentício, sendo o resultado das análises os únicos dados disponíveis para decidir sobre sua conveniência ou não, como ocorre nas importações de alimentos (21, 60).

Padrões microbiológicos para alimentos congelados são difíceis de interpretar uma vez que as contagens decrescem enquanto o alimento está congelado com uma velocidade que varia com os diferentes organismos e produtos (16). De acordo com Yeteriam e colaboradores (70) desde que a população bacteriana se altera durante a estocagem, podendo aumentar ou decrescer segundo o tratamento preservativo recebido pelo alimento, torna-se importante a época de colheita de amostras para realização das análises em cujos resultados serão baseados os padrões. Padrões obtidos sem levarem em conta este fato correm o risco de estabelecerem um alto nível bacteriano, sendo então muito permissivos, ou o contrário, tornar-se muito restritivos devido aos baixos níveis bacterianos encontrados. De qualquer forma, segundo os mesmos autores, os dados acumulados de análises de amostras obtidas de alimentos que sofreram estocagem e comercialização não refletem as condições de elaboração dos mesmos.

Para Read e Baer (52) os padrões devem ser aplicados a nível de varejo uma vez que é a qualidade dos alimentos nesse nível de comercialização que interessa aos consumidores, e é justamente onde são cometidos abusos na distribuição e exposição para venda. O estabelecimento de padrões bacteriológicos para produtos cárneos a nível de varejo no Estado de Oregon (USA) resultou em uma melhoria das condições sanitárias da carne comercializada, constituindo-se em ótimo instrumento para que se observassem boas práticas de manipulação e um controle de temperatura apropriado (10).

Os maiores problemas para a colocação em vigor de padrões bacteriológicos residem nos métodos de amostragem e análises (50). As inconsistências estatísticas na amostragem dos alimentos e a desuniformidade nos procedimentos analíticos fazem com que os resultados não sejam reproduzíveis (60). Regulamentos sobre alimentos que incluem padrões bacteriológicos devem designar com grande exatidão o método de amostragem e análise, incluindo: preparo da amostra, diluente e meio de cultura usados, tempo e temperatura de incubação (21).

Ingram (31) pensa que os padrões devam ser introduzidos de maneira experimental para que no decorrer da experiência se possa adaptá-los à realidade das indústrias de alimentos. Isto resulta-

ria em uma mais ampla aceitação dos níveis bacteriológicos finalmente adotados já que seria aquele alcançado pela maioria (45,52).

Outros autores (67, 60) são favoráveis ao estabelecimento dos padrões bacteriológicos mesmo de uma forma arbitrária uma vez que eles estimulam aperfeiçoamentos tanto na higiene durante a elaboração como no controle de qualidade exercido pela indústria, o que conduz a uma melhoria geral na qualidade dos alimentos.

B) A contagem total de bactérias aeróbias como índice de qualidade em alimentos.

A contagem total de bactérias aeróbias, também referida como contagem total em placas e contagem padrão em placas, é simplesmente uma avaliação do número total de bactérias aeróbias que compõem a flora de um alimento. Ela é frequentemente associada à segurança do alimento quanto a presença de patógenos; às condições higiênicas na manipulação e processamento do alimento; às condições de tempo/temperatura a que foi submetido o alimento durante a produção ou conservação; ao seu grau de decomposição e ao seu tempo de vida comercial (1,68).

Hobbs (apud 21) observou que geralmente os alimentos suspeitos de causar toxi-infecções apresentam contagens totais maiores que um milhão de bactérias por grama e usualmente maiores que dez milhões por grama; em alimentos normais as contagens ficam ao redor de cem mil por grama. Thatcher e Clark (68) consideram como não aptos para o consumo os alimentos que possuem um grande número de microrganismos (a exceção de produtos fermentados ou maturados), mesmo sabendo que não sejam patogênicos ou que não tenha havido ainda uma alteração acentuada dos caracteres organolépticos, já que há suspeitas de que bactérias comuns, geralmente não consideradas patógenas, como os estreptococos fecais, Proteus e pseudomonas, possam determinar intoxicações alimentares quando se encontram presentes em grande número nos alimentos.

Por outro lado, a existência de baixas contagens não assegura que o alimento esteja livre de patógenos (61,48). Hobbs e

Greenwood Wilson (apud 61) encontraram Salmonella em carnes onde havia baixas contagens totais e ausência de outros organismos de origem fecal. Thatcher (67) cita a ocorrência de surtos de salmonelose em crianças causados por gema de ovo com baixos níveis bacterianos. O mesmo autor descreve um caso de intoxicação estafilocócica a partir de leite em pó que não continha estafilococos viáveis.

Miskimin e colaboradores (48), procurando estabelecer correlações entre testes indicadores (contagem total, coliformes e Escherichia coli) e a presença de patógenos em alimentos potencialmente perigosos, concluíram que nenhum dos três testes serve para afirmar a segurança seja de alimentos crus ou de prontos para comer. Encontraram, porém, que os três testes correlacionam-se entre si, sendo então qualquer deles adequado para avaliar as condições de higiene durante o processamento de alimentos.

Read e Baer (52) fazem uma diferença clara entre a segurança microbiológica de um alimento, referindo-se à presença de patógenos ou suas toxinas, e a qualidade microbiológica deste alimento, referindo-se à sua situação frente a testes indicadores como a contagem total, coliformes, E.coli e Staphylococcus aureus. Concluem afirmando que, sendo a carga bacteriana de um alimento controlável através de boas práticas de elaboração, a contagem total serve como critério de qualidade na maioria dos alimentos processados.

A contagem total em placas pode ser usada como indicadora da decomposição incipiente em alimentos perecíveis (61,15). Geralmente, a contagem precisa atingir a casa dos milhões por grama para que se sinta a deterioração por meios sensoriais (15). A Tabela 1 mostra os níveis bacterianos verificados no ponto em que houve produção de odores e limo em alguns alimentos proteicos (42).

TABELA 1

NÍVEIS BACTERIANOS PARA FORMAÇÃO DE ODORES E LIMO
EM ALIMENTOS PROTEÍCOS

| alimento | Logaritmo do nº bactérias/g ou cm ² | |
|---------------|--|-------|
| | odor | limo |
| frangos | 5.2-8 | 7.5-9 |
| carnes | 6.3-8 | 6.5-8 |
| salsichas | 8-8.5 | 8.5 |
| ostras | 4-5.7 | - |
| carne de siri | 8 | - |
| peixes | 6-6.6 | - |

Contudo, na flora bacteriana de um alimento existem grupos de bactérias mais aptos a causarem deterioração que outros, e se estes grupos obtiverem alguma vantagem seletiva para o seu desenvolvimento em virtude do tipo de processamento, estocagem ou embalagem, então a deterioração poderá ocorrer a níveis de contagens totais relativamente baixos (61).

Para Castell (12), a contagem bacteriana total quando aplicada a filés frescos de peixes não reflete sua qualidade já que pode significar apenas uma contaminação recente, enquanto a qualidade é o resultado da ação bacteriana desde que o peixe foi capturado. Além disso, para o mesmo autor, a deterioração é mais relacionada a atividade de certas bactérias do que ao número total presente.

Para Elliot e Michener (21) a relação com a deterioração pode não ser válida se a alta contagem bacteriana foi devida a uma forte contaminação recente; porém, se a forte carga bacteriana verificada foi devido a crescimento, a deterioração pode ser perfei

tamente relacionada a esta carga. A vida de prateleira de alimentos estocados a temperatura que permita o crescimento bacteriano descrece marcadamente se a contagem inicial é alta (1).

Segundo Corllet (15), para que haja uma correta interpretação da contagem total em placas, é preciso que sejam conhecidas as condições sob as quais o alimento foi elaborado, desde a matéria prima utilizada, tipo de processamento, situação higiênica na planta, até as condições de estocagem. Sómente quando se tem estes conhecimentos é que a contagem total serve como índice de qualidade de alimentos.

C) A hipoxantina como índice de qualidade em pescado fresco e congelado.

A degradação dos nucleotídeos do músculo do pescado começa já no momento de sua morte ou logo após, dependendo das condições da captura, e prossegue durante a estocagem (22). Estudos efetuados em várias espécies (39,36,64,19), mostram que o nucleotídeo predominante, o trifosfato de adenosina (ATP), sofre um processo autolítico de desfosforilações e desaminação para formar o monofosfato de inosina (IMP), o qual é degradado à inosina e finalmente hipoxantina. Nesta última fase há interferência de enzimas bacterianas como indicado na figura 1, que mostra a seqüência de degradação do ATP no músculo juntamente com as enzimas que atuam em cada etapa (39,34):

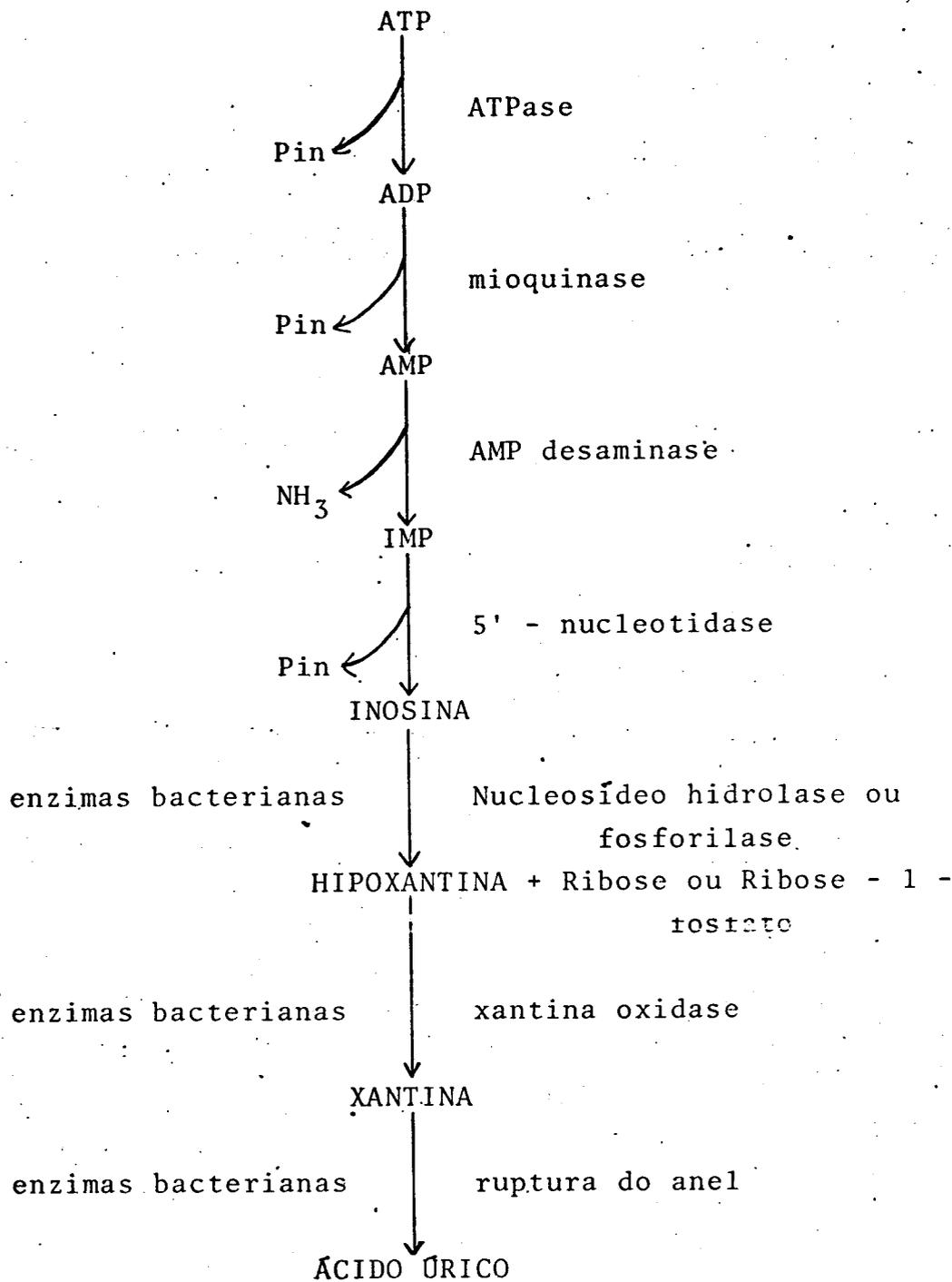


Figura 1: Sequência da degradação do ATP no músculo de peixe com enzimas que atuam em cada etapa.

Vários fatores influem nesta série de reações tais como a espécie do peixe, sua atividade durante a captura, a temperatura a que é submetido durante a armazenagem, suas condições fisiológi-

cas (30,19). Devido às reações de degradação a partir do IMP serem lentas, há uma tendência tanto ao seu acúmulo como dos compostos derivados (65).

Estes fatos levaram a tentativas para o estabelecimento de novos testes de frescor baseados na relação existente entre o desaparecimento dos nucleotídeos ou o aumento da concentração de seus catabólitos e o tempo de armazenagem em gelo. A vantagem destes testes em relação aos correntemente usados está em que eles fornecem elementos sobre o período inicial da armazenagem, quando ainda não se detectam sinais da decomposição bacteriana, enquanto que os outros, baseados justamente na determinação de compostos resultantes da atividade bacteriana, tem valor apenas quando quantidades significantes destes compostos tenham sido produzidos. Mas aí, o peixe já se encontra em um estágio incipiente de deterioração (39).

Assim, Shewan e Jones (58) sugeriram que a determinação da ribose liberada poderia servir como índice de qualidade do pescado conservado em gelo. Um outro método para avaliar o frescor baseado na determinação conjunta de hipoxantina e inosina foi descrito por Saito e colaboradores (53). No entanto, os resultados de trabalhos realizados em vários locais (39,30,34) indicam que a determinação apenas de hipoxantina seria o melhor teste de frescor para muitas espécies, pois enquanto a desfosforilação é completa ainda no período de aceitabilidade a hipoxantina acumula ao longo da deterioração, servindo assim como indicadora do grau de autólise e, também, da ação bacteriana, principalmente nas espécies em que a nucleosidase é pouco ativa (39).

Em 1964, Jones e colaboradores (37) descreveram um método enzimático para determinação da hipoxantina em músculo de pescado. O método é baseado na técnica usada por Kalckar (38) na análise de outros materiais biológicos e consiste na aplicação do princípio de espectrofotometria diferencial, com conversão enzimática da hipoxantina à ácido úrico. Os resultados obtidos com o procedimento de Jones e colaboradores correlacionam com a avaliação sensorial e concordam plenamente com aqueles obtidos por cromatografia de troca iônica, procedimento clássico para determinação da hipo-

xantina (37).

A partir daí difundiu-se o uso da determinação enzimática da hipoxantina para relacioná-la ao tempo de estocagem em gelo e à possibilidade de sua aplicação como índice de frescor para um grande número de espécies marinhas e de água doce ficou comprovada (41,18,27,63,64,24). Porém, quando a velocidade de degradação dos nucleotídeos é muito rápida ou muito lenta torna-se inadequado seu uso ou de seus catabólitos como índice de qualidade, tal é o caso das espécies canadenses Sebastes marinus e Xiphias gladius (30).

Morga (49) estudando a aplicação de alguns testes de frescor para avaliação da qualidade da pescada foguete (Macrodon ancylodon) conservada em gelo, concluiu que a determinação da concentração de hipoxantina é o que melhor correlaciona com a análise sensorial devido ao seu aumento constante durante todo o período de estocagem. Os dados obtidos ao longo da deterioração possibilitaram o estabelecimento de três faixas de aceitabilidade, sendo que a variação dos valores de hipoxantina e da soma dos pontos obtidos nos vários aspectos da avaliação sensorial em cada faixa foi a seguinte: na aceitável de 0,11 a 0,20 mg/g de músculo e de 24,7 a 15 pontos; na crítica de 0,20 a 0,25 mg/g de músculo e de 15 a 11 pontos; na inaceitável de 0,25 a 0,33 mg/g de músculo e de 11 a 1 ponto.

Os nucleotídeos e seus catabólitos, principalmente o IMP, por si só ou combinados a alguns aminoácidos como o ácido glutâmico, glicina, valina, alanina, metionina, realçam o sabor e o aroma do pescado (35,28). Assim, a degradação do IMP a hipoxantina é responsável por importantes mudanças organolépticas com o aparecimento de um sabor amargo no músculo (34). Hashimoto (28), baseado em trabalhos realizados por pesquisadores japoneses, questiona a associação da hipoxantina ao sabor e aroma do pescado. Spinelli (62) encontrou que concentrações de hipoxantina da ordem de 8,8 µM/g de músculo não produzem mudanças detectáveis no sabor e aroma do linguado (Eopsetta jordani), enquanto que concentrações muito menores no bacalhau já produzem estas alterações (34).

Dyer e colaboradores (19), estudando a influência da degradação dos nucleotídeos no sabor e aroma do peixe espada (Xiphias gladius) conservado em gelo e congelado, não detectaram qualquer mudança que pudesse ser relacionada ao seu desaparecimento ou formação de compostos intermediários, atribuindo este fato a relativa lentidão com que ocorre a degradação nesta espécie. Ressaltam, porém, que sendo mais altos os níveis de hipoxantina no músculo vermelho que no branco, o sabor amargo pode aparecer em espécies que possuem este músculo em maior proporção.

Foram também realizados alguns trabalhos sobre o comportamento dos nucleotídeos e seus derivados no músculo do pescado quando congelado. Jones (35) encontrou que a enzima 5' - nucleotidase é inativa no bacalhau congelado a -30°C , às nucleosidades a -20°C , mas que todas as seis enzimas que efetuam a degradação do ATP até hipoxantina são ativas a -14°C . Na temperatura de -14°C há a conversão um tanto rápida do IMP a inosina e a concentração de hipoxantina pode atingir níveis em que se detecta o sabor amargo. Estes fatos poderiam ser associados à perda do sabor e aroma do pescado congelado (34).

Em um trabalho mais recente, Connel (14) não encontrou variação no conteúdo de hipoxantina de filés de bacalhau (Gadus Callarias) congelados em vários estágios de frescor e armazenados a -14°C por períodos que variam de dias a um ano. A razão para a discrepância entre estes resultados e os obtidos por Jones (35) foi atribuída ao fato de este ter utilizado peixes em pré-rigor mortis, portanto em estado bioquímico diferente. Estes resultados mostraram, ainda a possibilidade de usar o teste de hipoxantina para obter informações sobre a qualidade do peixe antes do congelamento.

Spinelli e colaboradores (64) não verificaram variações na concentração de hipoxantina em filés da espécie Sebastodes alu tus armazenados por quatro meses a -29°C e também concluem que o teste serve como índice da qualidade do peixe ao ser congelado.

Embora o procedimento enzimático para a determinação da hipoxantina tenha mostrado ser o mais adequado por sua simplicidade, rapidez e sensibilidade, ele possui um sério inconveniente que é o de requerer um equipamento caro como o espectrofotômetro para sua realização. Isso fez com que o uso desta análise ficasse restringido aos laboratórios de pesquisa. Há tentativas de simplificar o procedimento com o objetivo de incorporar o teste a rotina do controle de qualidade da indústria.

Burt e colaboradores (7) desenvolveram um procedimento visual para avaliar a concentração de hipoxantina através da adição de um corante indicador de oxi-redução, o 2-6-diclorofenolindofenol, à mesma solução preparada para o método enzimático e que contém extrato muscular, tampão fosfato e xantina oxidase. Após a incubação verifica-se a intensidade da descoloração que é proporcional a quantidade de hipoxantina presente. Comparando resultados de análises realizadas pelos dois procedimentos os autores encontraram que haviam condenado ou aceitado as amostras com uma porcentagem de acerto de 94 e 95%, respectivamente.

Burt e colaboradores (6), com o mesmo procedimento anterior só que automatizado em um "Auto Analyzer", conseguiram uma redução expressiva no tempo de incubação e encontraram um coeficiente de correlação de 0,991 entre seus resultados e os obtidos através do procedimento enzimático clássico.

Utilizando, também, o procedimento com o indicador de oxi

-redução descrito por Burt e colaboradores (7), só que fazendo a leitura em um colorímetro, Beuchat (3) verificou que o teste da hipoxantina pode ser usado como índice de frescor para uma espécie de água doce, Ictalurus punctatus.

Mais recentemente, Jahns e colaboradores (33) empregaram - para a determinação de hipoxantina tiras de papel filtro embebidas em uma solução de resazurina, gelatina e xantina oxidase. Estas tiras eram imersas no extrato muscular e deixadas a temperatura ambiente algum tempo para que houvesse a reação. A intensidade de variação da coloração azul para rosa era comparada a de outras tiras imersas em soluções com quantidades conhecidas de hipoxantina para se obter a concentração aproximada no músculo.

D) Efeito das temperaturas de congelação sobre a microflora dos alimentos, especialmente do pescado.

Mazur (47) agrupa os microrganismos de acordo com sua resposta à congelação em quatro categorias: (a) os que virtualmente sobrevivem todas as condições de congelação e descongelação, (b) os que resistem ao ato de congelação mas são suscetíveis à armazenagem e algumas vezes à descongelação. (c) os que são sensíveis à congelação, armazenagem e descongelação sob algumas mas não todas as condições, (d) os que são inativados pela congelação sob quaisquer condições. Grande parte dos esporos e algumas células vegetativas, particularmente micrococos, estreptococos e estafilococos, estão na primeira categoria. A maioria dos outros microrganismos situam-se na segunda ou terceira categoria.

Os danos provocados pela congelação ocorrem principalmente na parede celular e nos processos metabólicos e enzimáticos dos microrganismos (23). Uma indicação de que há alterações na per -

meabilidade celular é a presença no meio que circunda a célula de solutos intracelulares como potássio, fosfato, açúcares fosforilados, nucleosídeos, e ácidos (47). Por outro lado, quando se expõem os microrganismos a temperaturas de congelação, muitas células perdem sua habilidade de crescerem em meios de cultura que lhes eram satisfatórios antes do tratamento. Estas células são consideradas metabólicamente injuriadas e caracterizam-se pelo requerimento de elementos nutricionais mais complexos para se desenvolverem (9). Embora algumas enzimas sejam alteradas pela congelação, a maioria delas é mais refratária que o próprio microrganismo à ação das baixas temperaturas uma vez que observa-se a ocorrência de muitas reações metabólicas específicas em células não viáveis (47).

Fennema e colaboradores (23) enumeram, como causa destes danos, os seguintes fatos que acontecem durante a congelação: a redução inicial da temperatura sem formação de cristais de gelo (choque térmico), a formação de cristais extracelulares, a formação de cristais intracelulares, a concentração de solutos.

O choque térmico é mais comumente observado em bactérias Gram negativas, principalmente se estão na fase de crescimento exponencial e sofrem um resfriamento rápido (23). Esta forma de injúria aos microrganismos está associada a alterações na permeabilidade celular (47).

A formação de cristais de gelo extracelulares por si não afeta apreciavelmente as células microbianas. Seu efeito é indireto pois provoca a saída de água do interior da célula em resposta a maior pressão de vapor que se estabelece quando a água do meio externo congela. Tanto esta desidratação celular como a con

gelação extracelular levam a uma concentração dos solutos em todo o sistema que é prejudicial aos microrganismos.

A formação de cristais intracelulares tem um efeito variável sobre as células microbianas, sendo que as grandes são mais sensíveis a esta condição que as pequenas (47). A morte dos microrganismos, quando ocorre imediatamente após a congelação, é atribuída a formação de cristais intracelulares (23).

A concentração dos solutos tanto fora como no interior da célula provoca um aumento na velocidade das reações químicas nas altas temperaturas de congelação; causa variações no pH que levam a precipitações de componentes da solução; causa mudanças na concentração e espécies de íons em solução que poderão afetar a estrutura de macromoléculas como o DNA e proteínas. Todas estas alterações parecem ser prejudiciais às células microbianas (47).

Os prejuízos causados por esta fase altamente concentrada e não congelada se fazem sentir mais durante o armazenamento a temperaturas de congelação moderadamente baixas e altas, muito embora, no caso de a velocidade de congelação ser excessivamente lenta, possa haver uma inativação dos microrganismos por parte dos solutos antes que a congelação se complete (23). Dependendo da composição no meio, esta concentração dos solutos pode atuar como agente protetor da célula microbiana (5).

Outros fatores que podem influenciar a susceptibilidade das células microbianas à congelação, segundo Mazur (47), são: a concentração inicial de células, idade das células (as do início da fase exponencial são mais suscetíveis), características genéticas e fisiológicas dos organismos.

De acordo com Christophersen (13), o efeito da congelação

na população bacteriana dos alimentos manifesta-se em três distintas fases (Figura 2). Na primeira fase (A) há um acentuado declínio devido ao ato da congelação em si. A segunda fase (B) é a do armazenamento, onde vai havendo uma destruição das células mais sensíveis com a progressiva seleção das mais resistentes. Na terceira fase (C) há a quase constância do número de sobreviventes - com a formação de uma flora característica.

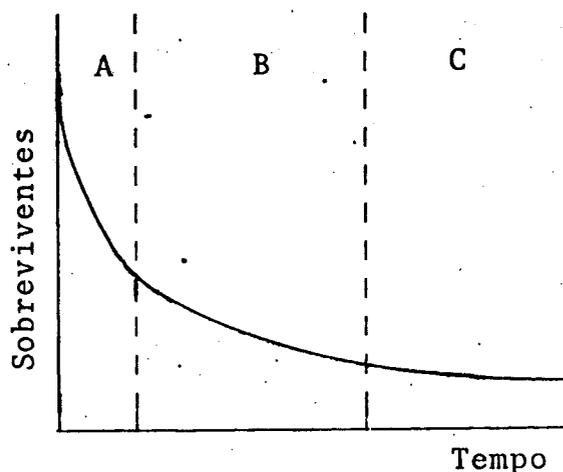


Figura 2: Efeito da congelação na flora bacteriana mista dos alimentos segundo Christophersen (13).

Nos alimentos marinhos submetidos a congelação há uma grande redução no número total de bactérias devido, provavelmente, a sua flora conter grande proporção de bactérias Gram negativas que são as mais sensíveis a este tratamento preservativo (23).

Kiser e Beckwith (40) observaram que a contagem total de bactérias no músculo de cavala decresce em 50% ou mais após a congelação e o armazenamento por 5 a 10 dias a -28°C . Congelando suspensões de bactérias isoladas da flora de cavala a -20°C por 15 dias, verificaram que o Achromobacter sp. sofre um decréscimo de quase 100% enquanto que o Micrococcus sp. resistiu melhor a esta condição.

Green (26), congelando a -18° C camarões adquiridos a nível de mercado, encontrou uma média de redução na contagem total de 50% após um dia de armazenamento e 82% após dois meses. A porcentagem de redução produzida por dois a doze meses de armazenamento a mesma temperatura em camarões provenientes diretamente dos barcos variou de 48 a 99%.

Lee e colaboradores (43), estudando o efeito de vários tratamentos preservativos na flora microbiana da espécie Sebastes alutus, verificaram uma redução de aproximadamente 83% na contagem total após um mês de armazenamento a -15° C. As proporções gênicas na flora também variaram passando as Pseudomonas de 23 a 27%, Achromobacter de 28 a 22%, Flavobacterium de 16 a 12%, Bacillus de 20 a 11%, Lactobacillus de 6 a 0%, Micrococcus de 4 a 1,5% e corineformes de 1 a 18%.

Insalata e colaboradores (32) demonstraram a presença de esporos de Clostridium botulinum tipo E em filês de peixe congelados e embalados a vácuo, não sendo, porém, constada a presença da exotoxina em nenhuma amostra analisada; mesmo após descongelação e incubação a 10° C por 28 dias.

E) Microflora do pescado fresco e deteriorado

Existe uma extensa bibliografia a respeito da flora do pescado recentemente capturado e de suas transformações ao longo da deterioração, principalmente por ser ela a grande responsável pelo escasso período de aproveitamento dos alimentos marinhos quando fora de seu ambiente natural.

Embora o músculo do peixe seja estéril ao ser capturado, a pele, as guelras e os intestinos (em peixes recentemente alimentados) possuem uma população bacteriana considerável, sendo seus

componentes, tanto quantitativa como qualitativamente, um reflexo do ambiente em que se encontram (56).

Watanabe (69), estudando a situação bacteriológica do pesca do na costa sul do Brasil, verificou que na pesca realizada próxima da costa, os peixes ao saírem da água apresentavam contagens de 10^5 a 10^7 bactérias por cm^2 de pele e um elevado número de coliformes, mantendo este nível por ocasião do desembarque. Na pesca de alto mar, os peixes apresentavam contagens nunca superiores a 10^3 por cm^2 de pele que elevava-se a $10^4 - 10^6$ no desembarque.

De acordo com Shewan (57), nos peixes provenientes das águas frias do hemisfério norte, predominam as bactérias psicrófilas Gram negativas (Pseudomonas, Alteromonas, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacterium/Cytophaga e Vibrio) enquanto que nos provenientes de águas tropicais e sub-tropicais predominam as mesófilas Gram positivas (Micrococcus, Bacillus e corineformes). Contudo, adverte o autor, mesmo em peixes destas águas mas quentes poderá haver um maior número de bactérias Gram negativas.

O peixe pode ainda albergar bactérias de significância em saúde pública como Clostridium botulinum tipos E, F e B, Vibrio parahaemolyticus e, no caso de serem provenientes de água poluídas, Salmonella, Shigella e Escherichia coli (57).

A flora bacteriana da pescada é representada, principalmente, por espécies dos gêneros Pseudomonas (32%), Achromobacter (35%), Flavobacterium, Bacillus, Micrococcus e corineformes (46).

Em 720 culturas isoladas de pele e guelras de pescada fogueite, Bonilla (4) encontrou que 77% eram bastonetes Gram negativas, 11% eram cocos Gram positivos, 7% eram bacilos Gram positivos, e 5% eram cocos Gram negativos. Quando amostras de pele e guelras

eram colocadas a diferentes temperaturas em um incubador gradiente havia um melhor crescimento dos cocos Gram positivos abaixo de 22° C e acima de 37,5°C, enquanto os bastonetes Gram negativos cresciam melhor entre 26 e 36° C.

Morga (49), comparando contagens de bactérias no músculo e guelras de pescada foguete obtidas em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação, verificou contagens mais altas a 20° C não encontrando diferenças significativas entre os meios.

Em sua maioria, as bactérias envolvidas na deterioração dos alimentos marinhos pertencem aos gêneros Pseudomonas e Achromobacter (46). Após os primeiros dias do peixe capturado e conservado em gelo vai-se processando uma mudança em sua flora no sentido da predominância destes dois gêneros, seja pela sua melhor capacidade de utilizar os compostos nitrogenados não proteícos abundantes no músculo (46), seja pelo seu curto tempo de geração em relação aos outros membros da flora (57).

Estudos realizados para verificar a incidência de tipos que produzem os odores característicos de deterioração mostraram que seu número nunca chega a mais de 20% da população bacteriana total do pescado, não sendo nada constatado quanto a contribuição dos 80% restantes para a decomposição (44,29).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

A. Materia prima

A matéria prima utilizada constou de pescada foguete (Macrodon ancylodon) de tamanho médio (25 - 30 cm) distribuída em cinco lotes de 25 kg. Foi adquirida no Entrepósito de Pesca de Santos, SP, na fase de comercialização, após 6 a 8 dias de captura, no período de junho a setembro de 1976. Os peixes eram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo na proporção 1:1 e transportados ao laboratório. Manteve-se esta proporção durante todo o experimento pela adição diária de quantidades adequadas de gelo.

B. Equipamentos

Além dos equipamentos e aparelhos rotineiramente usados em laboratório de Microbiologia, foram utilizados os seguintes:

- Espectrofotômetro ZEISS PMQ II
- Congelador METALFRIO HF-200
- Contact Plate Freezer 1048 da Tecquipment Limited Nottingham - England

C. Reagentes e meio de cultura

Para a análise química foram usados Ácido Perclórico (Fisher Scientific); Hidróxido de Potássio (Merck); Xantina Oxidase (Boehringer 4U/ml); Hipoxantina (Sigma).

Para a análise bacteriológica usou-se Plate Count Agar (Difco) como meio de cultura, e solução de Ringer como diluente.

2. Métodos

A. Avaliação sensorial

Foi realizada por uma equipe de quatro técnicos em pescado baseados nas recomendações da Torry Research Station (Scotland) para peixe *in natura*, descritas por Shewan e colaboradores (59); Anexo 1.

B. Preparo da matéria prima

Após a avaliação sensorial procedia-se a filetagem e acondicionamento dos filês para posterior congelação. As etapas seguidas na elaboração dos filês foram:

- a) Lavagem e descamação - os peixes foram lavados com água clorada a 5ppm antes e depois de serem descamados. A descamação foi realizada com o bordo sem fio da faca de filetear.
- b) Fileteamento - a retirada dos filês foi feita sob água clorada corrente observando-se os cuidados para não causar rompimentos de vísceras e reduzir ao mínimo a contaminação. Os peixes e filês foram mantidos sempre em ambiente refrigerado não adquirindo nunca ao longo do processamento temperaturas superiores a 10° C.
- c) Embalagem - os filês foram acondicionados em papel alumínio e moldados em formas plásticas cujas dimensões eram 9 cm de comprimento, 6 cm de largura e 3 cm de altura. Os blocos formados continham as porções anteriores de 4 filês de diferentes peixes. Foram elaborados 8 blocos, suficientes para a realização de análises antes e imediatamente após dois métodos de congelação, depois de uma semana, um mes e dois meses de armazenamento.
- d) Congelação e armazenagem - foram realizados dois tipos de congelação:
 1. congelação rápida em placas a -40° C
 2. congelação lenta em ambiente com ar em repouso a -22° C

Foram tomadas as temperaturas através de um termopar de cobre e constantan inserido no centro geométrico do bloco e construídas as curvas de congelação para os dois processos (Figuras 3 e 4). Os blocos foram armazenados a -22° C.

C. Obtenção das amostras

Para obtenção de amostras do peixe conservado em gelo foram

homogeneizadas as porções anteriores de 4 filês em liquidificador por um minuto, sendo daí coletadas quantidades suficientes para a realização das análises.

Para obtenção de amostras dos filês congelados, os blocos foram deixados a temperatura ambiente o tempo suficiente para permitir o corte de quantidades adequadas à realização das análises.

Excetuando-se a avaliação sensorial, feita diariamente, as demais análises no peixe conservado em gelo foram realizadas em dias alternados.

D. Análise química

Consistiu na determinação da concentração de hipoxantina no músculo, feita pelo método de Jones e Murray (37); Anexo 2.

E. Análise bacteriológica

Foi feita a contagem de bactérias nos filês segundo as recomendações da A.P.H.A. para o "Standard Plate Count" (54); Anexo 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação sensorial

Na análise sensorial do peixe *in natura* feita segundo as recomendações da Torry Research Station avaliam-se quatro aspectos diferentes da deterioração atribuindo-se notas em separado a cada um deles. A soma destas notas pode variar desde um máximo de 25 pontos, para o peixe absolutamente fresco, até a nota mínima, quando já ocorre putrefação.

A Figura 5 (página 41) mostra a relação entre a soma dos pontos obtidos na avaliação sensorial dos cinco lotes de pescada foguete e o seu tempo de conservação em gelo a partir do desembarque. A soma dos pontos obtidos no primeiro dia pelos diferentes lotes variou entre 23,5 e 20, o que demonstra que já ocorreu uma considerável perda na qualidade. Este fato é próprio do sistema de pesca existente no sul do Brasil, onde o barco passa períodos bastante longos no mar até que se encham seus porões, o que resulta em uma baixa qualidade do peixe por ocasião do desembarque, podendo mesmo ocorrer, segundo relatou Watanabe (69), que o produto das primeiras capturas já chegue deteriorado ao porto.

Os resultados por nós encontrados foram bastante similares aos de Morga (49) que observou que a pescada foguete achava-se em um estado de frescor aceitável para consumo *in natura* até o quinto dia após o desembarque, quando atingia cerca de 15 pontos na avaliação sensorial. Porém, em se tratando de peixe para a obtenção de filés para congelação, acreditamos que 20 pontos seria o limite máximo adequado para sua utilização, já que nesse estágio do processo deteriorativo percebe-se uma perda acentuada na textura e o aparecimento de odores não característicos no músculo que poderão intensificar-se durante o armazenamento. Também, nesta etapa, os filés já apresentam uma alta contaminação bacteriana após a elaboração, o que será discutido mais adiante.

2. Determinação da concentração de hipoxantina

2.a. No peixe conservado em gelo

O fator mais importante a ser considerado quando se quer apli

car o teste da hipoxantina como índice de qualidade a uma determinada espécie de peixe conservada em gelo é a velocidade com que ocorre seu acúmulo no músculo. Este acúmulo, em algumas espécies, pode ser tão rápido ou tão lento, segundo a atividade das enzimas que atuam na degradação do ATP, que torna o uso do teste inadequado para elas.

Para os cinco lotes de pescada foguete mantidos em gelo por sete dias utilizados neste trabalho, observamos um aumento gradativo na concentração de hipoxantina entre 0,09 e 0,27 mg/g de músculo, conforme pode ser visto na Figura 6 (página 42). Isto indica a possibilidade de aplicação do teste a esta espécie com vistas a se conhecer seu tempo de armazenamento em gelo. No entanto, ressaltamos o fato de que nossos dados foram obtidos a partir de peixes adquiridos por ocasião do desembarque, não se conhecendo seu tempo exato de captura até aquele momento. Portanto, permanece por ser feito um estudo mais completo de modo a acompanhar o acúmulo da hipoxantina nesta espécie desde o momento de sua captura para assim estabelecer as relações reais entre seus níveis no músculo e o tempo de permanência em gelo; muito embora possa-se dizer, de acordo com o tempo aproximado de captura fornecido pelos pescadores (ao redor de 7 dias), que a velocidade de acumulação encontrada foi similar as verificadas por Jones (36) para o bacalhau, Kassemarn e colaboradores (39) para duas espécies de linguado, Fraser e colaboradores (24) para a cavala e Burt e Simmonds (8) para a merluza do cabo.

Os valores de hipoxantina encontrados foram também comparados com a soma dos pontos obtidos na avaliação sensorial com o intuito de verificar a relação entre seu acréscimo e o aparecimento de sinais característicos da deterioração e não apenas o tempo de armazenamento em gelo, conforme pode ser visto na figura 7 (página 43). As concentrações verificadas na faixa de aceitabilidade do peixe (entre 25 e 15 pontos) variaram entre 0,09 e 0,18 mg/g de músculo, sendo que quando começou a haver rejeição devida a acentuada perda de qualidade (menos de 15 pontos) os valores situaram-se de 0,19mg/g para cima. Estes resultados concordam com aqueles encontrados por Morga (49) em seu trabalho com a pescada fo-

guete .

Hiltz e colaboradores (30) observam que as espécies com velocidades de acumulação média, onde os níveis de hipoxantina situam-se entre 2 e 3 $\mu\text{M/g}$ (0,27 e 0,39 mg/g) no limite de aceitabilidade, são as que mais se adaptam ao uso desse teste para avaliar sua qualidade. De outra forma poderemos ter velocidades de acumulação muito lentas como no caso do peixe espada, observado por Dyer e colaboradores (19), que atinge apenas 1 $\mu\text{M/g}$ (0,13 mg/g) no ponto de rejeição, ou o inverso, como é o caso da espécie Sebastes marinus, relatada por Hiltz e colaboradores (30), que tem o acúmulo de hipoxantina completo em menos de três dias após a captura, enquanto o peixe ainda conserva sua máxima qualidade.

Apesar de a velocidade de acumulação da hipoxantina no músculo da pescada foguete não atingir a recomendada por Hiltz e colaboradores (30) para a aplicação do teste, acreditamos que mesmo assim ela sirva como índice de qualidade para esta espécie devido ao seu aumento progressivo durante o armazenamento no gelo.

2.b. Nos filês congelados

A Tabela 2 (página 47) e Tabela 3 (página 48) mostram a estabilidade nos níveis de hipoxantina nos filês obtidos de pescada foguete em vários graus de deterioração após serem submetidos a congelação rápida e lenta e subsequente armazenamento a -22°C por oito semanas. Estes resultados demonstram que, nesta espécie, a atividade dos nucleosídeos é nula ou tão pouco intensa a essas temperaturas que não se detecta sua ação depois dos dois meses de armazenamento, o que permite-nos usar as concentrações de hipoxantina nos filês congelados nestas condições como indicadora de sua qualidade antes da congelação.

Nossos resultados concordam com os encontrados por Connel (14) para o bacalhau, Hiltz e colaboradores (30) para o peixe espada e Spinellicci e colaboradores (64) para a espécie Sebastes alutus.

3. Determinação da contagem bacteriana total

3.a. Nos filês após elaboração

Antes de se congelar os blocos de filês, realizava-se contagens

totais com os objetivos de verificar sua carga bacteriana ao se iniciar a congelação e, também, de verificar os níveis atingidos por esta carga nos filês obtidos sob boas práticas de elaboração (ver página 23) a partir de peixes em vários estágios de deterioração, definidos pela soma dos pontos da avaliação sensorial.

Os resultados apresentados na Figura 8 (página 44) mostram que as contagens no produto final aumentam a medida que o peixe utilizado na elaboração dos filês diminui de qualidade, e que quando ele obtém entre 20 e 21 pontos na avaliação sensorial o número de bactérias já atinge níveis responsáveis por alterações organolépticas desagradáveis, ou seja, de 10^6 bactérias por grama de músculo. O aumento progressivo das contagens encontradas indica que resultam de crescimento bacteriano não se tratando de contaminações grosseiras durante a manipulação, já que se assim fosse as contagens obtidas seriam bastantes variáveis.

Estes resultados são similares aos encontrados por Castell (11) ao verificar a influência do tempo de armazenamento em gelo no número de bactérias de filês de peixes que não eram lavados antes da filetagem. Porém, esse mesmo autor observou que as contagens totais nos filês provenientes de peixes que eram lavados antes da filetagem decresciam a medida que aumentava o tempo de permanência em gelo, atribuindo este fato à ocorrência de mudanças físicas e químicas no muco superficial do pescado que o tornam mais facilmente removível com o passar do tempo de armazenamento.

A discrepância entre estes últimos resultados e os encontrados por nós provavelmente deve-se ao fato de Castell ter trabalhado com peixes entre 1 e 5 dias de armazenamento em gelo, enquanto o peixe utilizado em nosso trabalho já encontrava-se ao redor de 7 dias em gelo ao ser desembarcado.

3.b. Nos filês após congelação e armazenamento

A Figura 9 (página 45) mostra o efeito da congelação a -40° C e posterior armazenamento a -22° C por oito semanas na população bacteriana existente nos filês. A porcentagem média de sobrevivência a este processo foi 42%, tendo havido variações entre 66 e 18%. Depois de uma semana de armazenamento esta porcentagem média

de sobrevivência caiu a 19,7%, com variações entre 39 e 5%; na quarta semana baixou a 11,5% com variações entre 28 e 2% e na oitava semana ficou em 9% com variações entre 20 e 1,2%.

Na Figura 10 (página 46) podem ser vistas as variações quantitativas ocorridas na flora bacteriana dos filés após congelação a -22°C e armazenamento por oito semanas igualmente a -22°C . Neste processo a porcentagem média de sobreviventes foi de 38%, havendo variações entre 67 e 11%. O efeito de uma semana de armazenamento resultou em uma queda média de sobreviventes a 23%, com variações entre 45 e 10%; na quarta semana a média de sobrevivência era de 15% com variações entre 26 e 1,8% e na oitava semana 11% com variações entre 20 e 2%.

Com relação ao efeito das velocidades de congelação sobre a população bacteriana dos alimentos, observa-se na literatura que as mais lentas são as mais letais por haver um maior tempo de exposição do microrganismo às altas concentrações de solutos (25, 51, 71). No entanto, embora se tenha utilizado um processo de congelação rápido (Figura 3, página 39) e outro lento (Figura 4, página 40), os resultados encontrados foram bastante similares. Acreditamos que este fato está relacionado a grande proporção de bactérias Gram negativas existentes na flora do pescado, as quais são altamente sensíveis ao choque térmico um tanto intenso que ocorreu em ambos os processos, o que concorda com as observações de Fennema e colaboradores (23).

As curvas de sobrevivência para os dois processos mostraram ao longo do armazenamento decréscimo pequeno nas contagens, em relação à queda inicial devida à congelação, tendendo à estabilização ao final das oito semanas. Estes resultados concordam com o pequeno ou nenhum decréscimo nas contagens observados por Elliot e Michener (20) em vários alimentos congelados e armazenados a diferentes temperaturas. Eles observaram, também, que a porcentagem de sobrevivência aumentava a medida que se reduziam estas temperaturas. Estes dados não nos foi possível comparar uma vez que trabalhamos com apenas uma temperatura de armazenamento.

As curvas de sobrevivência encontradas coincidem com aquela proposta por Christophersen (13) para ilustrar as três fases de

destruição dos microrganismos que compõem a flora mista dos alimentos congelados, já apresentada anteriormente neste trabalho (Figura 2, página 18).

A queda no número de bactérias após a congelação e armazenamento permite ainda observarmos as dificuldades para se interpretar os resultados das contagens totais nos filés congelados quando não são conhecidas as condições de elaboração. Embora altas contagens após algum tempo de armazenagem possam significar que a matéria prima utilizada foi de qualidade inferior ou que tenha havido más condições sanitárias na manipulação, a recíproca não é verdadeira. Conforme foi bem enfatizado na revisão bibliográfica, antes de se aplicar os resultados das contagens totais como expressão da qualidade sanitária de um alimento é necessário que haja um acúmulo suficiente de dados sobre os níveis bacterianos esperados quando se variam a qualidade da matéria prima, ou o tipo de processamento, ou o tempo de armazenamento a temperaturas de congelação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angelloti, R. 1964. Significance of total counts in bacteriological examination of foods. In Examination of Foods for Enteropathogenic and Indicator Bacteria. K. Lewis and R. Angelloti (eds.). Division of Environmental Engineering and Food Protection, U.S. Public Health Service, Publication nº 1142.
2. Angelloti, R. 1971. Catered convenience foods - Production and distribution problems and microbiological standards. J. Milk Food Technol. 34 (5): 227-231.
3. Beuchat, L.R. 1973. Hypoxanthine measurement in assessing freshness of chilled channel catfish (Ictalurus punctatus). J. Agr. Food Chem, 21 (3): 453-455.
4. Bonilla S., G. 1976. Aplicação dos parâmetros de crescimento microbiano para avaliar o grau de contaminação da pesca da fogueira. Tese de mestrado. Biblioteca Fac. de Eng. de Alimentos e Agrícola. Unicamp, Campinas, S.P.
5. Borgstrom, G. 1961. Unsolved problems in frozen food microbiology. In Proceedings Low Temperature Microbiology Symposium. Campbell Soup Company., pp. 197-251.
6. Burt, J.R., J. Murray and G.D. Stroud. 1968. An improved automated analysis of hypoxanthine. J. Fd. Technol. 3: 165-170.
7. Burt, J.R., G.R. Stroud and N.R. Jones. 1969. Estimation of hypoxanthine concentrations in fish muscle by a rapid visual modification of the enzymatic assay procedure. In Freezing and Irradiation of Fish. ed. R. Kreuzer Fishing News (Books) Ltds., London, pp. 367-370.

8. Burt, J.R. and C.K. Simmonds. 1971. Hypoxanthine as an indicator of freshness in iced capshake before freezing and after thawing. In Fishing Inspection and Quality Control. ed. R. Kreuzer, Fishing News (Books) Ltd., London, pp. 196-202.
9. Busta, F.F. 1976. Practical implication of injured microorganisms in foods. J. Milk Food Technol. 39 (2): 138-145.
10. Carl, K.E. 1975. Oregon's experience with microbiological standards for meat. J. Milk Food Technol. 38 (8): 483-486.
11. Castell, C.H. 1947. The control of fillet contamination in fish plants. Part I. A study about actual conditions. Progr. Repts. Atlant. Coast Stations. Fish Res. Bd. of Canada n° 39.
12. Castell, C.H., G.W. Anderson and H. Pivnick. 1948. Relation of bacterial counts to quality of cod fillets. J. Fish. Res. Bd. Can. 7 (6): 378-388.
13. Christophersen, J. 1968. Effect of freezing and thawing on the microbial population of foodstuffs. In Low Temperature Biology of Foodstuffs. J. Hawthorn and E. Rolfe (editors). Pergamon Press Ltd. (London), pp. 251-269.
14. Connel, J.J. 1969. Changes in the eating quality of frozen stored cod and associated chemical and physical changes. In Freezing and Irradiation of Fish, ed. R. Kreuzer, Fishing News (Books) Ltd., London, pp. 367-330.
15. Corlett Jr., D.A. 1974. Setting microbiological limits in the food industry. Food Technol. 28: 34, 36-38, 40.
16. Dack, G.M. 1956. Evaluation of microbiological standards for foods. Food Technol. 10: 507-509.
17. Dick, M.I.B. 1970. Microbial standards for foods. Fd. Technol. in Aust. 22 (9): 508-509, 511, 513, 515.

18. Dugal, L.C. 1967. Hypoxanthine in iced freshwater fish. J.Fish. Res. Bd. Canadá, 24 (11) 2229-2239.
19. Dyer, W.J., D.I.Fraser and D.Lohnes. 1966. Nucleotide degradation and quality in ordinary and red muscle of iced and frozen swordfish (Xiphias gladius). J.Fish. Res. Bd. Canada, 23 (12): 1821-1833.
20. Elliot, R.P. and H.D.Michener. 1960. Review of the microbiology of frozen foods. In conference on Frozen Food Quality. Albany, Cal. U.S. Dept. of Agriculture, Publication ARS-74-21.
21. Elliot, R.P. and H.D.Michener. 1961. Microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods. A review. Appl. Microbiol. 9 (5): 452-468.
22. Eskin, N., Henderson and R.Townsend. 1971. Biochemical changes in foods: meat and fish. In Biochemistry of Foods, chapter 1. Academic Press, Inc. (London) Ltd., pp. 1-29.
23. Fennema, O., W.D.Powrie and E.H.Marsh. 1973. Behavior of food microorganisms during freeze-preservation. In Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 386-398.
24. Fraser, D.I., D.Pitts and W.J.Dyer. 1968. Nucleotide degradation and Organoleptic quality in fresh and thawed mackerel muscle held at and above ice temperature. J.Fish. Res. Bd. Canada, 25 (2): 239-253.
25. Frazier, W.C.. 1972. Microbiología de los Alimentos (2^a edición). Editorial Acribia, Zaragoza, España. 512 p.
26. Green, M. 1949. Bacteriology of shrimp. III, Quantitative studies on frozen shrimp. Food Res. 14: 384-394.
27. Guardia, E.J. and G.Haas. 1969. Evaluation of muscle hypoxan-

thine and volatile bases as potencial quality indices for industrial bottomfishes from the Gulf of Mexico. *Fishery Industrial Research* 5 (3): 117-120.

28. Hashimoto, Y. 1965. Taste-producing substances in marine products. In *The technology of Fish Utilization*, ed. R. Kreuzer, Fishing News (Books) Ltd., London, pp. 57-61.
29. Herbert, R.A., M.Hendrie, D.M.Gibson, and J.M.Shewan. 1971. Bacteria active in the spoilage of certain seafoods. *J. Appl. Bact.* 34 (1): 41-50.
30. Hiltz, D.F., W.J.Dyer, S.Nowlan ar J.R.Dingle. 1971. Variation of biochemichal quality indices by biological and technological factors. In *Fishing Inspection and Quality Control*, ed. R.Kreuzer, Fishing News (Books) Ltd., London, pp. 191 - 195.
31. Ingram, M. 1961. Microbiological standards for foods. *Food Technol.* 15 (2): 4-6, 8-9, 12.
32. Insalata, N.F., G.J.Fredericks, J.H.Berman, and E.Barker, 1967. Clostridium botulinum type E in frozen vacuum-packed fish. *Food Technol.* 21 (3): 296-298.
33. Jahns, F.D., J.Howe, R.Coduri Jr. and A.Rand Jr. 1976. A rapid visual enzyme test to asses fish freshness. *Food Technol.* 30: 27-30.
34. Jones, N.R. 1965. Hypoxamthine and other purine-cointaining fractions in fish muscle as indices of freshness. In *the technology of fish utilization*, ed. R.Kreuzer, Fishing News (Books) Ltd., London, pp. 179-183.
35. Jones, N.R. 1965. Interconversions of flavorful nucleotide catabolites in chilled and frozen fish. Vol. II Proc. XI Inter. Congr. Refrig. Munich, 1963. Pergamon Press, London

36. Jones, N.R. and J.Murray. 1962. Degradation of adenine and hypoxanthine nucleotide in the muscle of chill-stored trawled cod (Gadus callarias). J.Sci. Fd. Agric., 13: 475-480.
37. Jones, N.R., J.Murray, E.I.Livingston and C.K.Murray. 1964. Rapid estimations of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish. J.Sci. Fd. Agric. 15: 763-774.
38. Kalckar, H.M. 1947. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I. Determinations of hydroxypurine compounds. J.Biol. Chem. 167: 429-443.
39. Kassemarn B.O., B.Sanz Perez, J.Murray and N.P.Jones. 1963. Nucleotide degradation in the muscle of iced haddock (Gadus aeglefinus), lemon sole (Pleuronectes microcephalus), and plaice (Pleuronectes platessa). J.Food Sci. 28: 28-37.
40. Kiser, J.S. and T.D.Beckwith. 1942. Effect of fast-freezing upon bacterial flora of mackerel. Food Res., 7 (4): 255-259.
41. Kuusi, T. and M.Aalto. 1968. On post-mortem changes in the nucleotides of freshwater fish muscle. J. Fd. Technol. 3: 107-114.
42. Lechowich, R.V. 1975. An evaluation of microbiological standards and microbiological quality standards for foods. Association of Food and Drug Officials Quarterly Bulletin 40: 27-34.
43. Lee, J.S., L.Crystal, S.Robison, and R.O.Snnhuber. 1967. Comparative effect of chlortetracycline, freezing, and γ radiation on microbial population of ocean perch. Appl. Microbiol. 15: 368-372.

44. Lerke, P., R.Adams and L.Farber. 1965. Bacteriology of spoila
ge of fish muscle. III. Characterization of spoilers. Appl.
Microbiol. 13 (4): 625-630.
45. Levine, M. 1961. Facts and fancies bacterial indices in stan-
dards for water and foods. Food Technol. 15: 29-34.
46. Liston, J. 1973. Microbial spoilage of fish and seafoods. IV.
Conferência Internacional, Impactos Globais da Microbiolo-
gia Aplicada, São Paulo, 23-28 julho 1973.
47. Mazur, P. 1966. Physical and chemical basis of injury in sin-
gle-celled Microorganisms subjected to freezing and tha-
wing. In Cryobiology. H.Meryman (ed.). Academic Press, Inc.
(London). pp. 214-310.
48. Miskimin, D.K., K.A.Berkowitz, M.Solberg, W.E.Richa Jr., W.C.
Franke, R.L.Buchaman and V.O'Leary. 1976. Relationships bet-
ween indicator organisms and specific pathogens in potential-
ly hazardous foods. J.Food Sci 41 (5): 1001-1006.
49. Morga, A.A. 1975. Avaliação do Índice de frescor da pescada
foguete (Macrodon ancylodon) conservada em gelo. Tese de
mestrado. Biblioteca da Fac. de Eng. de Alimentos e Agrí-
cola. Unicamp, Campinas, S.P.
50. Murray, J.G. 1975. Microbiological standards for food. Proc.
IFST 8 (2): 81-87.
51. Peterson, A.C. and M.F.Gunderson. 1968. Microbiology of frozen
foods: In The Freezing Preservation of Foods, vol. 2. chap-
ter 13. D.Tressler (ed.). AVI Publishing Company, Inc.
Westport, Connecticut.
52. Read Jr., R.B. and E.F.Baer. 1974. Role of the regulatory in
setting microbiological quality standards. Food Technol. 28:
42, 44, 46.

53. Saito, T. K. Arai and K. Matsuoyoshi, 1959. A new method for estimating the freshness of fish. Bull. Japan. Sci. Fish. 24: 749-750.
54. Sharf, J.M. 1966. Recommended methods for the microbiological examination of foods (second edition). American Public Health Association, Inc. Washington, D.C.; 205 p.
55. Shewan, J.M. 1970. Bacteriological standards for fish and fishery products. Chemistry and Industry (1970): 193-199.
56. Shewan, J.M. 1971. The microbiology of fish and fishery products. A progress report. J. Appl. Bact. 34 (2): 299-315.
57. Shewan, J.M. 1976. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. Torry Research Station, Aberdeen, U.K.
58. Shewan, J.M. and N.R. Jones. 1957. Chemical changes occurring in cod muscle during chill storage and their possible use as objective indices of quality. J. Sci. Food. Agric. 8: 491-498.
59. Shewan, J.M.R. MacIntosh, C. Tucker and A. Ehrenberg 1953. The development of a numerical scoring system for the sensory assessment of the spoilage of wet white fish stored in ice. J. Sci. Food Agric. 4: 283-298.
60. Shiffman, M.A. And D. Kronick. 1963. The development of microbiological standards for foods. J. Milk Food Technol. 26 (4): 110-112.
61. Silliker, J.H. 1963. Total counts as indexes of food quality. In Microbiological Quality of Foods. ed. by Slanetz et. al., Academic Press, New York, N.Y. p. 102.
62. Spinelli, J. 1965. Effect of hypoxanthine on the flavor of

fresh and stored low-dose-irradiated petrale sole fillets.
J. Food Sci. 30: 1063-1067.

63. Spinelli, J. 1967. Degradation of nucleotides in ice-stored halibut. J. Food Sci. 32: 38-41.
64. Spinelli, J., M. Eklund and D. Miyanchi. 1964. Measurement of hypoxanthine in fish as a method of assessing freshness. J. Food Sci. 29: 710-714.
65. Tarr, H.L.A. 1966. Post-mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates, and sugar in fish muscles - A review, J. Food. Sci. 31: 846- 854.
66. Thatcher, F.S. 195. Microbiological standards for foods: Their function and limitations. J. Appl. Bacteriol. 18: 449-461.
67. Thatcher, F.S. 1958. Microbiological Standards for foods: II. What may microbiological standards mean? Food Technol. 12: 117-112.
68. Thatcher, F.S., T.D.S. Clark. 1975. Analisis microbiológico de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza (España). 271 p.
69. Watanabe, K. 1963. Aspectos bacteriológicos do pescado da costa sul do Brasil. I. Da área de pesca até o porto de descarga. Bol. Instit. Ocean. USP 12 (3): 69-100.
70. Yeterian, M., L. Chugg, W. Smith and C. Coles. 1974. Are microbiological standards Workable? Food Technol. 28: 23,26,32.
71. Zaitsev, V.P. 1965. Preservation of fish products by refrigeration (translated from russian). Israel Program for Scientific Translations Ltd., Jerusalem. 314 p.

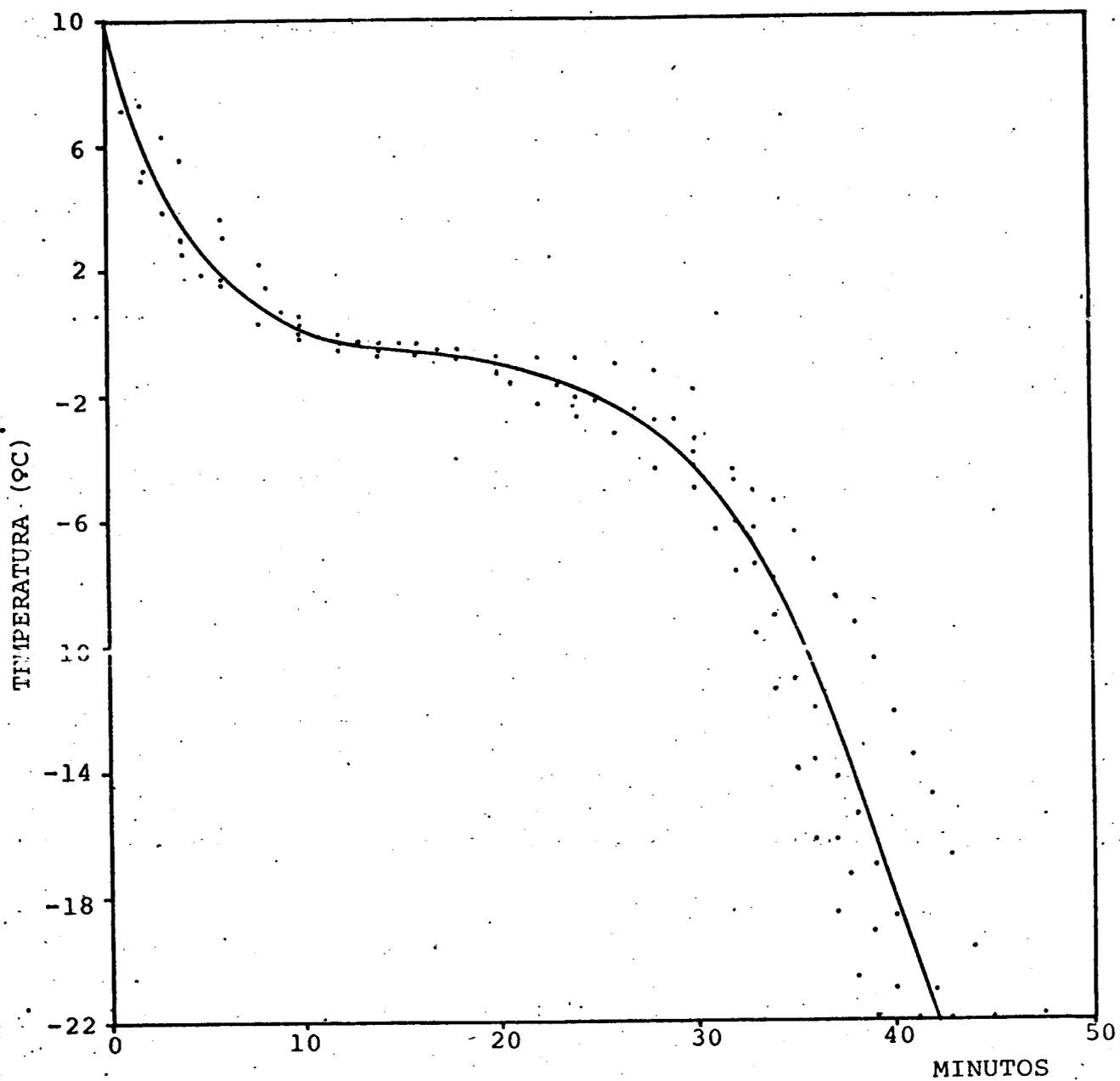


FIGURA 3 - Forma da curva de congelamento nos blocos de filés de pescada foguete congelados em placas a -40°C .

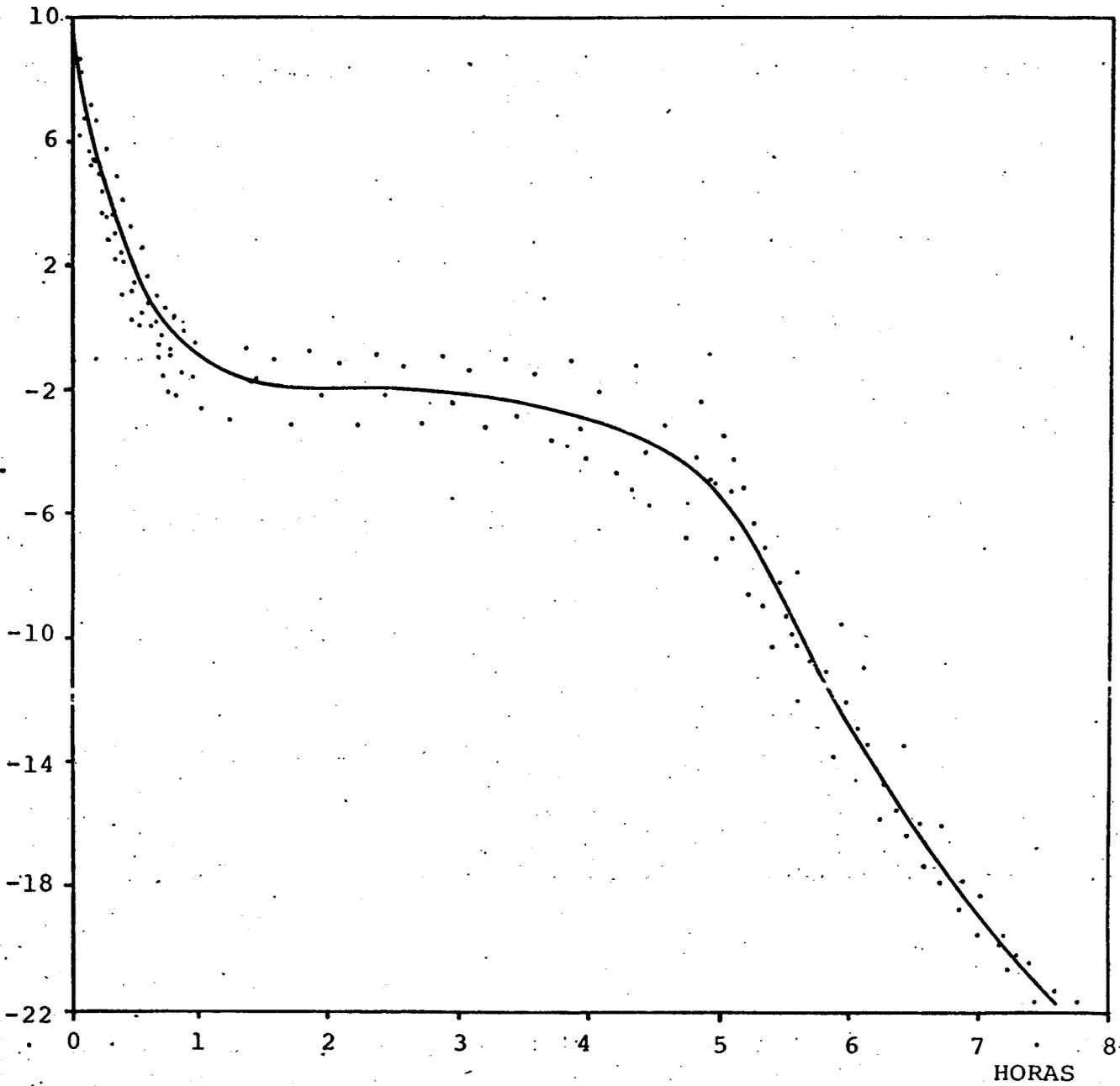


FIGURA 4 - Forma da curva de congelamento nos blocos de filés de pescada foquete congelados em ar em repouso a -22°C .

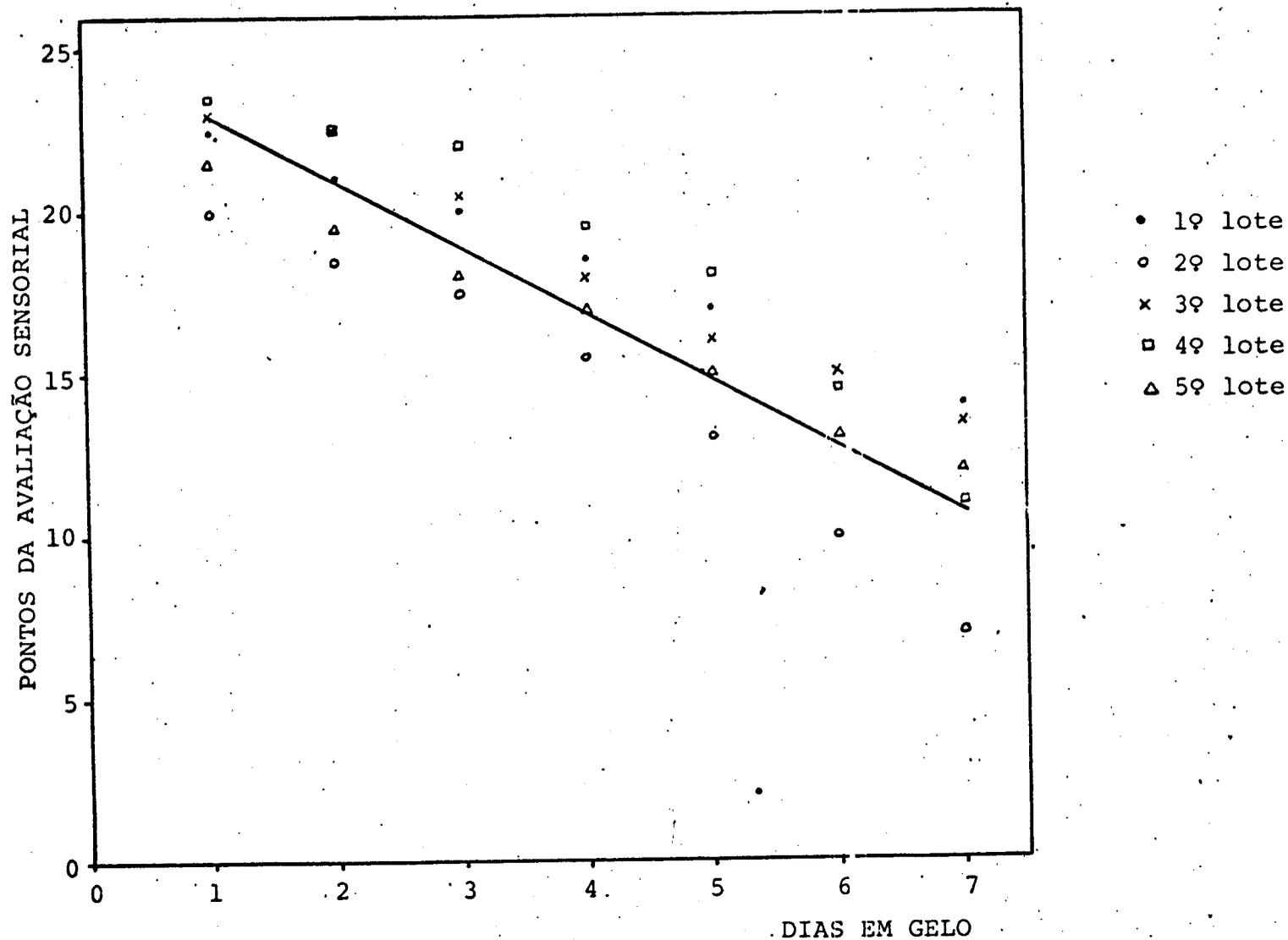


FIGURA 5.- Relação entre a soma dos pontos obtidos na avaliação sensorial da pescada foguete e os dias de conservação em gelo após o desembarque.

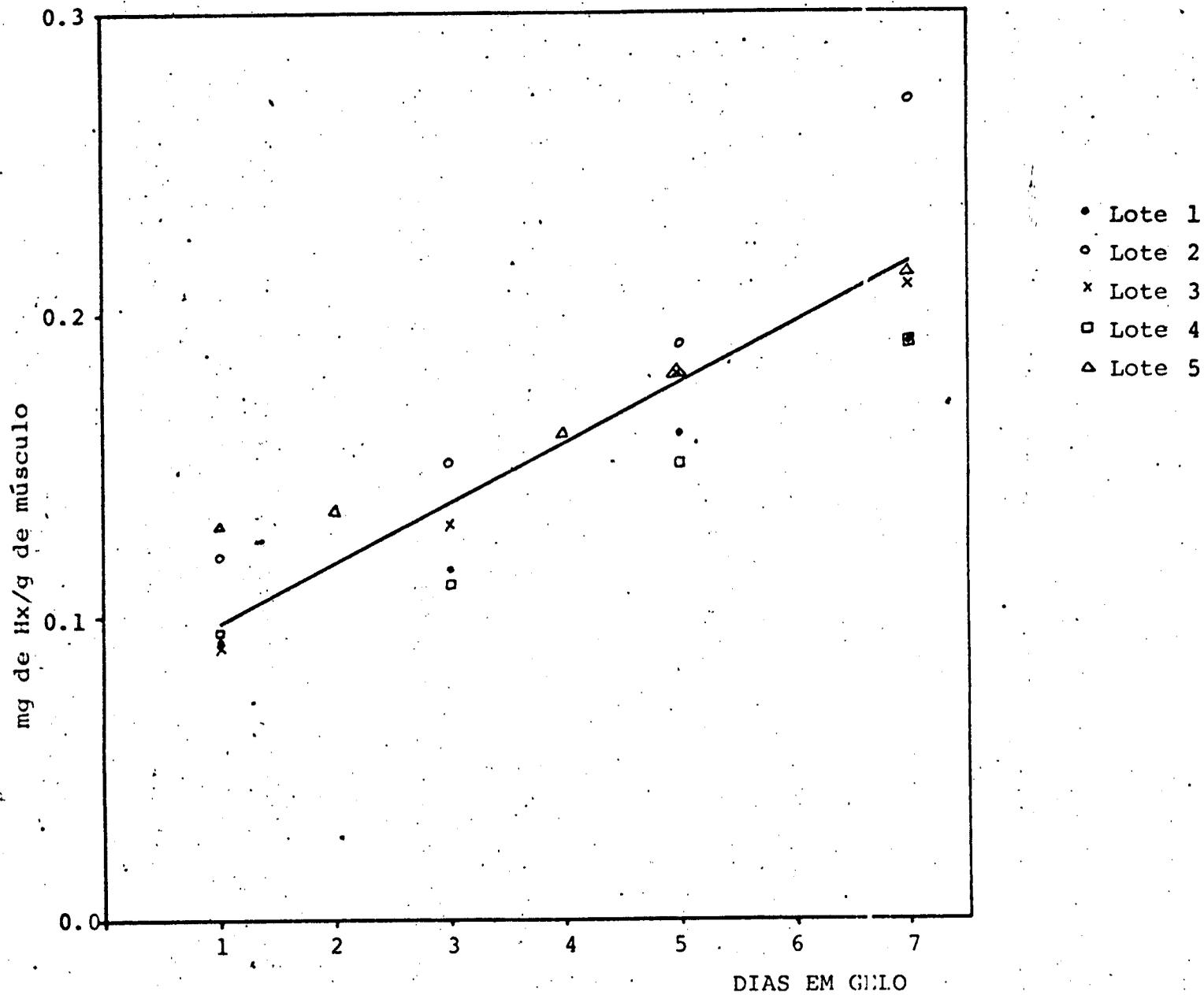


FIGURA 6 - Acumulação de hipoxantina no músculo de pescada-foguete conservada em gelo por sete dias após o desembarque.

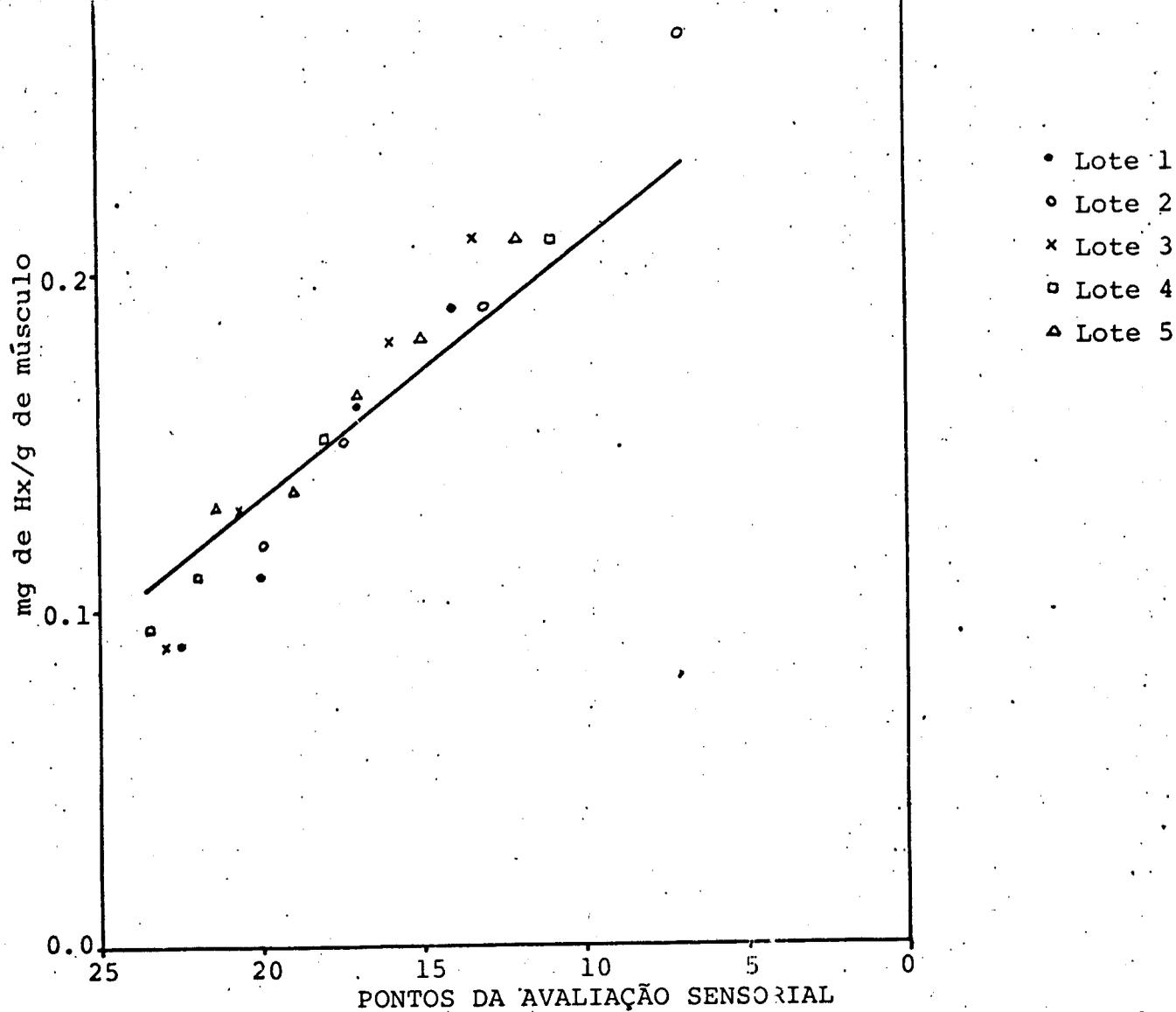


FIGURA 7 - Relação entre a soma dos pontos obtidos na avaliação sensorial da pescada fogueira conservada em gelo e a concentração de hipoxantina no músculo.

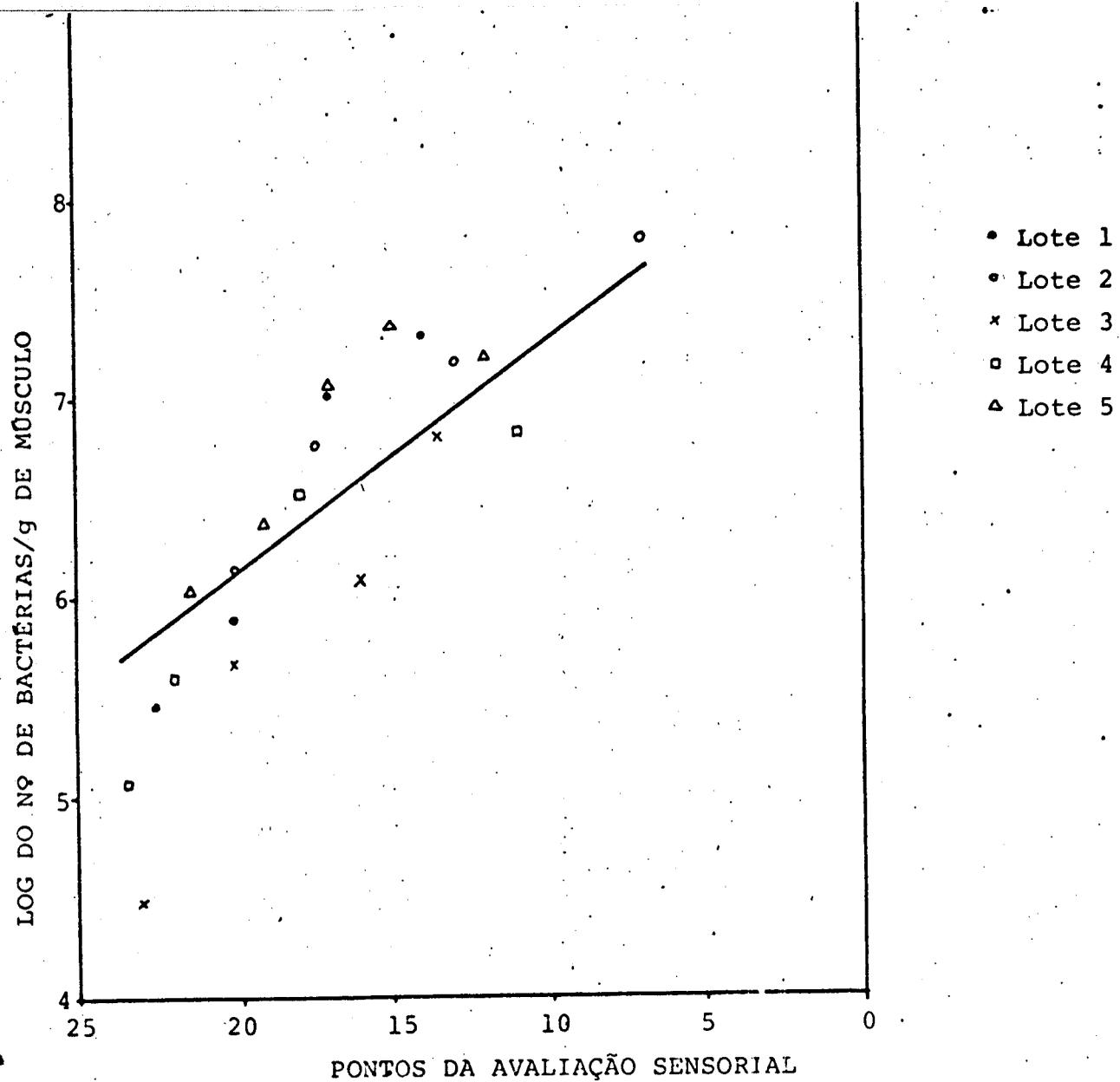


FIGURA 8 - Relação entre a soma dos pontos obtidos na avaliação sensorial e o logaritmo do número de bactérias nos filês de pescada foguete após a elaboração.

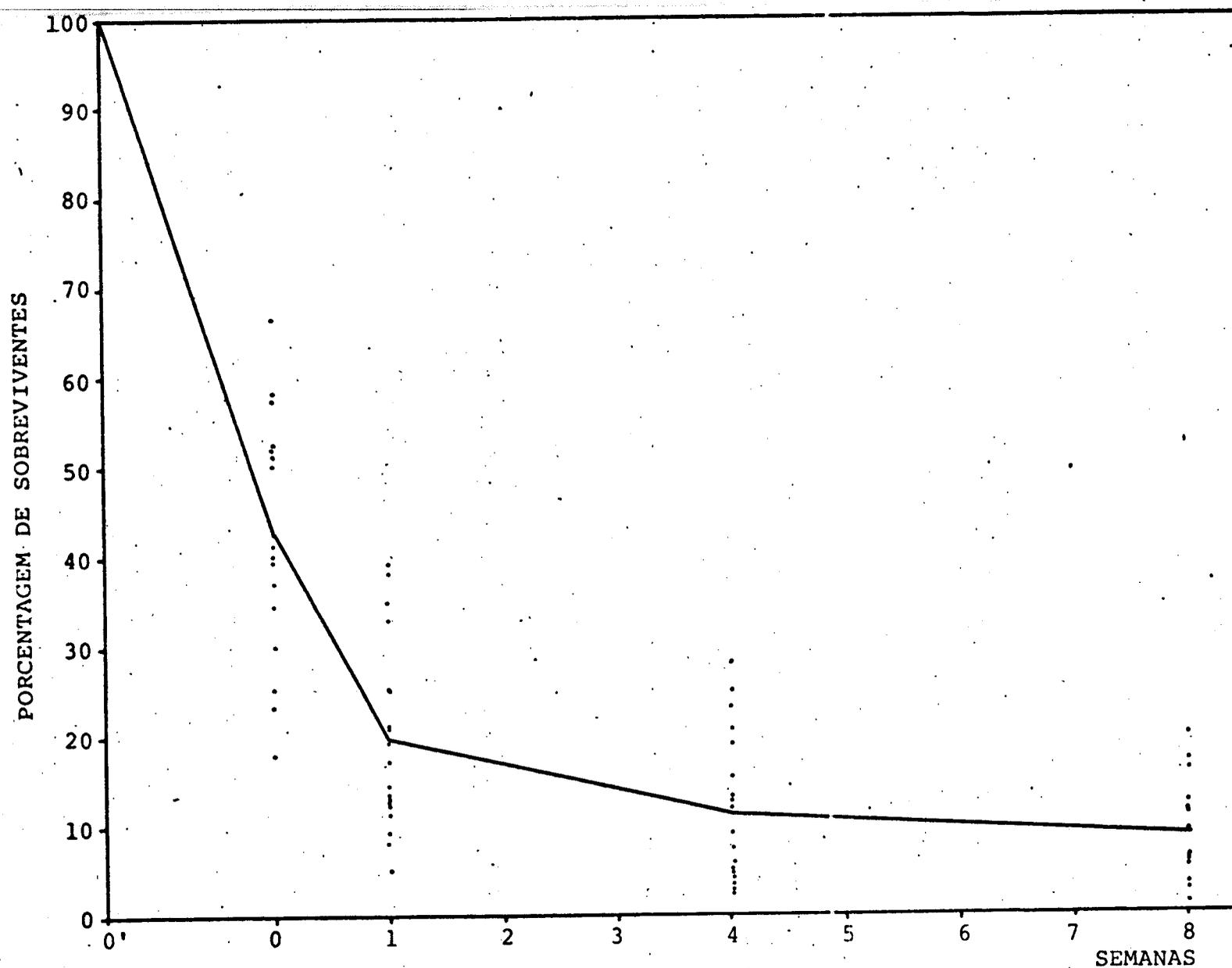


FIGURA 9 - Efeito do congelamento em placas à -40°C (distância 0' - 0) e posterior estocagem a -22°C por 8 semanas na flora existente nos filês de pescada fogueite após a elaboração.

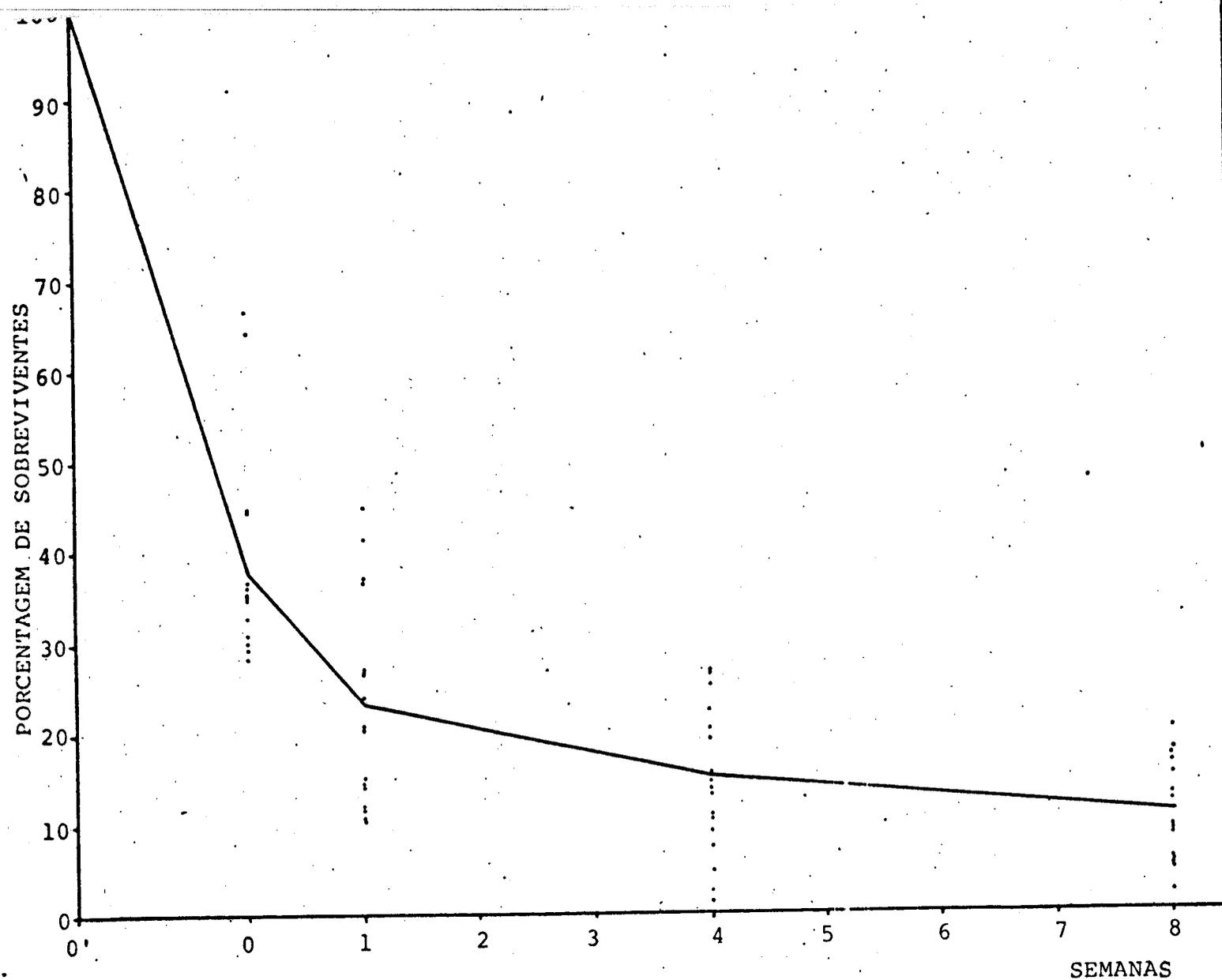


FIGURA 10 - Efeito do congelamento em ar em repouso a -22°C (distância 0' - 0) e posterior estocagem à mesma temperatura por 8 semanas na flora existente nos filés de pescada foguete após a elaboração.

Tabela 2. Variações na concentração de hipoxantina de filés obtidos de pescada foguete em vários graus de deterioração, congelados rapidamente em placas a -40°C e armazenados a -22°C por oito semanas.

| Dias de armazenagem em gelo | Soma dos pontos na avaliação sensorial | Concentração de hipoxantina (mg/g de músculo) | | | | |
|-----------------------------|--|---|-------------------|----------|-----------|-----------|
| | | Antes de congelar | Após a congelação | | | |
| | | | imediatamente | 1 semana | 4 semanas | 8 semanas |
| 1 | 22,5 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,10 |
| 3 | 20,0 | 0,11 | 0,11 | 0,10 | 0,11 | 0,10 |
| 5 | 17,0 | 0,16 | 0,15 | 0,14 | 0,15 | 0,16 |
| 7 | 14,0 | 0,19 | 0,18 | 0,19 | 0,18 | 0,19 |
| 1 | 20,0 | 0,12 | 0,12 | 0,13 | 0,13 | 0,13 |
| 3 | 17,5 | 0,15 | 0,15 | 0,14 | 0,15 | 0,15 |
| 5 | 13,0 | 0,19 | 0,18 | 0,17 | 0,19 | 0,18 |
| 7 | 7,0 | 0,27 | 0,28 | 0,30 | 0,28 | 0,28 |
| 1 | 23,0 | 0,09 | 0,10 | 0,11 | 0,11 | 0,11 |
| 3 | 20,5 | 0,13 | 0,13 | 0,15 | 0,13 | 0,13 |
| 5 | 16,0 | 0,18 | 0,17 | 0,18 | 0,19 | 0,18 |
| 7 | 13,5 | 0,21 | 0,22 | 0,22 | 0,22 | 0,21 |
| 1 | 23,5 | 0,09 | 0,10 | 0,10 | 0,09 | 0,09 |
| 3 | 22,0 | 0,11 | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,11 |
| 5 | 18,0 | 0,15 | 0,15 | 0,14 | 0,15 | 0,14 |
| 7 | 11,0 | 0,21 | 0,21 | 0,20 | 0,22 | 0,21 |
| 1 | 21,5 | 0,13 | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,13 |
| 2 | 19,0 | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,13 | 0,14 |
| 4 | 17,0 | 0,16 | 0,17 | 0,17 | 0,16 | 0,16 |
| 5 | 15,0 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,18 |
| 7 | 12,0 | 0,21 | 0,21 | 0,21 | 0,20 | 0,21 |

Tabela 3. Variações na concentração de hipoxantina de filês obtidos de pescada foguete em vários graus de deterioração, congelados lentamente em ar em repouso a -22° C e armazenados a mesma temperatura por oito semanas.

| Dias de armazenagem em gelo | Soma dos pontos na avaliação sensorial | Concentração de hipoxantina (mg/g de músculo) | | | | |
|-----------------------------|--|---|-------------------|----------|-----------|-----------|
| | | Antes de congelar | Após a congelação | | | |
| | | | imediatamente | 1 semana | 4 semanas | 8 semanas |
| 1 | 22,5 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,09 |
| 3 | 20,0 | 0,11 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,11 |
| 5 | 17,0 | 0,16 | 0,15 | 0,14 | 0,16 | 0,15 |
| 7 | 14,0 | 0,19 | 0,20 | 0,19 | 0,20 | 0,19 |
| 1 | 20,0 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,13 | 0,13 |
| 3 | 17,5 | 0,15 | 0,15 | 0,16 | 0,15 | 0,15 |
| 5 | 13,0 | 0,19 | 0,19 | 0,18 | 0,19 | 0,19 |
| 7 | 7,0 | 0,27 | 0,28 | 0,28 | 0,30 | 0,30 |
| 1 | 23,0 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,10 | 0,10 |
| 3 | 20,5 | 0,13 | 0,13 | 0,13 | 0,13 | 0,14 |
| 5 | 16,0 | 0,18 | 0,18 | 0,17 | 0,18 | 0,18 |
| 7 | 13,5 | 0,21 | 0,21 | 0,22 | 0,22 | 0,22 |
| 1 | 23,5 | 0,09 | 0,10 | 0,10 | 0,11 | 0,10 |
| 3 | 22,0 | 0,11 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,12 |
| 5 | 18,0 | 0,15 | 0,14 | 0,15 | 0,16 | 0,15 |
| 7 | 11,0 | 0,21 | 0,22 | 0,21 | 0,21 | 0,22 |
| 1 | 21,5 | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,13 |
| 2 | 19,0 | 0,13 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| 4 | 17,0 | 0,16 | 0,16 | 0,17 | 0,17 | 0,17 |
| 5 | 15,0 | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,18 | 0,19 |
| 7 | 12,0 | 0,21 | 0,22 | 0,21 | 0,22 | 0,21 |

ANEXO 1

Procedimento para avaliação sensorial do peixe *in natura*

| A) Aparência geral (5 pontos) | Pontos |
|--|--------|
| Olhos perfeitamente frescos, pupila negra convexa, córnea translúcida, guelras vermelho vivas (dependendo da espécie), nenhuma viscosidade bacteriana, água viscosa externa branca ou transparente, reflexo opalino brilhante, nenhum descoramento. | 5 |
| Olhos ligeiramente fundos, pupila cinzenta, ligeira opacidade da córnea, alguma descoloração das guelras e algum muco, viscosidade exterior opaca e um tanto leitosa, perda do reflexo opalino e alguma descoloração. | 3 |
| Olhos fundos, pupila branco-leitosa, córnea opaca, viscosidade externa grossa e nodosa com alguma descoloração bacteriana. | 2 |
| Olhos ligeiramente afundados, cabeça encolhida coberta por grossa viscosidade bacteriana amarela, guelras mostrando descoramento ou descoloração marrom escura, viscosidade externa grossa e amarelo-marrom, frescor inteiramente desaparecido, descoramento e encolhimento acentuado. | 0 |
| B) Carne, incluindo abas abdominais (5 pontos) | |
| carne translúcido-azulada, nenhuma vermelhidão ao longo da espinha dorsal ou descoloração das abas abdominais, rim vermelho-vivo. | 5 |
| Aparência cerosa, nenhuma vermelhidão ao longo da espinha dorsal, brilho original do sangue do rim, alguma descoloração das abas abdominais. | 3 |
| Alguma opacidade e certa vermelhidão ao longo da espinha dorsal, sangue do rim marrom e certa desco | |

| | Pontos |
|---|--------|
| loração das abas. | 2 |
| Carne opaca, acentuada descoloração vermelha ou marrom, sangue marrom ou terroso, acentuada descoloração das abas. | 0 |
| C) Odores das guelras (10 pontos) | |
| Odores frescos de algas marinhas. | 10 |
| Perda do odor de algas marinhas e de crustáceos. | 9 |
| Ausência de odores neutros, odor de mofo, de rato, leitoso, caprílico, odor de alho e pimenta ou odores afins. | 7 |
| Odores de pão, malte, cerveja, fermento. | 6 |
| Odores de ácido lático, leite azedo, oleoso. | 5 |
| Alguns odores de ácidos graxos inferiores (acético, butírico), cheiro de grama, de borracha ve | 4 |
| lha, odores ligeiramente adocicados, de frutas, semelhante ao clorofórmio. | |
| Odores de água de repolho estragada, de nabo, fósforos molhados, odores semelhante ao fosfeno. | 3 |
| Odores amoniacais (trimetilamina e outras aminas), toluidina. | 2 |
| Odores de H ₂ S e outros compostos sulfurados, odores amoniacais. | 1 |
| Odor de indol, amônia, odores fecais, nauseabundos, pútridos. | 0 |
| D) Textura (5 pontos) | |
| Firme, elástica ao toque dos dedos. | 5 |
| Amolecimento da carne, alguma arenosidade. | 3 |
| Carne mais mole, arenosidade definida, escamas facilmente removíveis, destacáveis da carne. | 2 |
| Muito mole e flácida, retem as impressões dos dedos, arenosidade bastante acentuada, carne facilmente destacável da espinha dorsal. | 1 |

ANEXO 2

Procedimento para determinação da hipoxantina

A. Preparo do extrato

Amostras de 25g foram homogeneizadas em liquidificador com 50ml de ácido perclórico 0,6N mantido sob refrigeração. O homogeneizado foi rapidamente filtrado a vácuo a 0° C. Tomou-se alíquota de 50 ml do filtrado a 0° C e ajustou-se o pH a 6,5-7.0 com hidróxi do potássio a 30%. Após, o volume foi acertado a 75ml com água destilada. O perclorato de potássio formado foi removido por centrifugação a 5000rpm a 0° C.

B. Estimação da hipoxantina

À 0,5ml do extrato centrifugado juntou-se 2ml de água destilada, 2ml de tampão fosfato (pH 7,6), 0,5ml de solução de xantina oxidase recentemente diluída. Depois de agitar colocou-se em banho maria a 37° C por minutos. O branco foi tratado da mesma forma, apenas sem o extrato. A conversão a ácido úrico foi verificada a 290nm. As leituras foram comparadas a padrões de hipoxantina tratados de maneira similar.

C. Preparo da solução de xantina oxidase

Diluiu-se 0,16ml da solução concentrada de xantina oxidase 4U/ml para 10ml com tampão fosfato. Cada 0,5 ml desta solução continha 0,032 U de enzima.

ANEXO 3

Procedimento para a contagem total em placas

Juntou-se 50g de filês com 450ml de solução de Ringer em copo

de liquidificador comum esterelizado com álcool a 70%. Homogenizou-se por 2 minutos. Apartir desta, foram feitas diluições até 10^{-6} utilizando-se frascos com 90ml de diluente. Colocou-se 1ml de cada diluição em placas de Petri, em duplicata, e adicionou-se o meio para contagem previamente derretido e resfriado a 45°C , deixando solidificar após agitação adequada para obter uma distribuição uniforme das colônias. Incubou-se a 20°C por 72 horas e contou-se as placas contendo entre 30 e 300 colônias. O número de colônias formadas foi multiplicado pela recíproca da diluição para se obter a quantidade em gramas. Os resultados obtidos foram expressos em logarítmo do número de bactérias.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos ao Dr. Fumio Yokoya por sua orientação.

À Direção da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas que facilitou os meios de realização do trabalho.

Ao Professor A. Alexandre Morga por sua valiosa ajuda ao longo de todo o trabalho.

Aos Professores Lincoln C. Neves F^o e Frederick C. Strong III pelas facilidades proporcionadas para o uso de equipamentos e aparelhos sob sua responsabilidade.

Ao pessoal de apoio do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

À Universidade Federal de Pelotas e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo suporte financeiro.