



**UAAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Estudo da deterioração da amêijoa-boia  
*Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)**

Fábio Correia Mota

Trabalho Final de Mestrado em Tecnologia de Alimentos  
Departamento de Engenharia Alimentar

Dissertação orientada por

Prof. Dr. Eduardo Esteves

Prof. Dr. Jaime Aníbal

2013



**UAAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Estudo da deterioração da amêijoa-boia  
*Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)**

Fábio Correia Mota

Trabalho Final de Mestrado em Tecnologia de Alimentos  
Departamento de Engenharia Alimentar

Dissertação orientada por

Prof. Dr. Eduardo Esteves  
Prof. Dr. Jaime Aníbal

2013

# **Estudo da deterioração da amêijoa-boia**

## ***Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)**

### **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Fábio Correia Mota)

Copyright 2013 Fábio Correia Mota

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Para a realização do presente trabalho muitos foram aqueles que contribuíram, sem eles teria sido difícil atingir esta nova etapa na minha vida. A todos os envolvidos direta e indiretamente quero agradecer toda a ajuda e apoio que deram ao longo desta jornada.

Em primeiro lugar, quero dirigir o meu muito obrigado aos meus orientadores, Doutor Eduardo Esteves e Doutor Jaime Aníbal, por todo o apoio, disponibilidade, profissionalismo e simpatia com que me receberam ao longo deste ano, sem eles não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao pessoal que integrou o painel de provadores, Joana Dias, Eng. Hélder Madeira, Dr. Rui Cruz, Sandra Agostinho, Sílvia Madeira, Eng. Teresa Soeiro, Eng. Vera Francisco e Eng. Vera Gonçalves, pela paciência e pelo tempo que lhes ocupei, sem eles seria difícil obter resultados.

À Eng. Teresa Cavaco e Eng<sup>a</sup> Vera Gonçalves, por toda a ajuda fornecida com os reagentes e adaptação ao laboratório de química.

À Eng. Teresa Soeiro, por toda a disponibilidade para ajudar demonstrada sempre que era necessário.

À Eng. Neuza Rodrigues, por todo o apoio e paciência que teve comigo no laboratório de microbiologia, sem ela teria sido difícil concluir o trabalho.

Ao Eng. Hélder Madeira, pela amizade e disponibilidade para ajudar sempre que foi necessário.

À Eng. Joana Lopes, pela disponibilidade e enorme ajuda que me deu no laboratório de microbiologia, tornando todo o trabalho mais fácil.

A todo o pessoal de apoio dos vários laboratórios, desde assistentes de laboratório a funcionárias da limpeza a quem ocupei tempo e paciência, agradeço a todos o apoio.

Aos meus pais, por todo o apoio e incentivo que me deram ao longo de todos estes anos na universidade para que avançasse e alcançasse este momento, sem eles nada disso teria sido possível.

Por fim, quero agradecer à Joana Dias por todo o apoio ao longo desse percurso e por toda a ajuda que me deu, teria sido difícil apresentar este trabalho sem a sua ajuda.

A todos o meu **Muito Obrigado!**

## Resumo

A amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) é um dos moluscos bivalves mais consumidos em Portugal e uma das espécies com maior peso comercial. Na Ria Formosa, Algarve, cultiva-se cerca de 90% da produção amêijoia-boia em Portugal.

Neste trabalho, estudou-se a dinâmica da mortalidade de amêijoia-boia não-depurada sob condições de conservação similares às praticadas no circuito comercial e utilizou-se o teor em azoto básico volátil total (ABVT) para analisar a deterioração *post-mortem* dos bivalves conservados a diferentes temperaturas (5, 15 e 25 °C). Mais ainda, estudou-se o efeito da depuração sobre a qualidade biológica/comercial (índice de condição e percentagem de edibilidade), físico-química (pH e ABVT), microbiológica (contagens de microrganismos viáveis totais, de *Enterobacteriaceae* e de psicrotóxicos) e sensorial (espécimes crus e cozidos) de amêijoia-boia conservada em refrigeração.

A mortalidade de amêijoia não-depurada conservada em refrigeração seguiu um modelo logístico cuja taxa de mortalidade ( $r$ ) foi de  $0,37 \text{ d}^{-1}$  e o  $t_{50}$  foi de 19,3 dias.

Na experiência em que se estudou o efeito da temperatura sobre a deterioração *post-mortem* dos bivalves, observou-se que não ocorreu grande variação na dinâmica dos parâmetros de qualidade biológica/comercial e teor em ABVT mas o pH diminuiu claramente a 15 °C. A temperatura de conservação influenciou a taxa de incremento (exponencial) do teor em ABVT (de  $0,012 \text{ h}^{-1}$  a 5 °C até  $0,103 \text{ h}^{-1}$  a 25 °C).

Relativamente o efeito da depuração, parece que não influenciou a qualidade biológica/comercial das amêijoas mas afetou a dinâmica do pH e, em menor grau, do teor em ABVT e contribuiu para estender a sobrevivência de amêijoia (+3 dias em termos de  $t_{50}$ ). Em termos microbiológicos, o efeito da depuração, diminuindo a carga microbiana em 1-2 log(UFC/ml), verificou-se nas primeiras 24-48 h do ensaio; posteriormente a dinâmica (exponencial) dos parâmetros microbiológicos estudados foi análoga. A concentração de microrganismos nas amostras ultrapassou valores internacionalmente aceites com limites muito depois do  $t_{50}$  ou período habitual de consumo. Finalmente, verificou-se que as amêijoas depuradas, cruas ou cozidas, possuem aceitabilidade organolética durante mais tempo ( $t_{50}=9,7 \text{ d}$ ) do que as amêijoas não-depuradas ( $t_{50}=5,3 \text{ d}$  e  $t_{50}=7,2 \text{ d}$ , para amêijoas cruas e cozidas).

**Palavras-chave:** Amêijoia-boia, Depuração, Deterioração, Temperatura, ABVT, Qualidade microbiológica e sensorial.

## Abstract

The grooved carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) is one of the most consumed shellfish in Portugal, being also one of the most important commercial shellfish species cultivated on inshore waters. About 90% of these clams cultivated in Portugal are produced in the Ria Formosa, Algarve.

Herein, the mortality dynamics of non-depurated clams stored under similar conditions to those used in the commercial circuit was studied. The total volatile basic nitrogen content (TVB-N) was used to assess the spoilage of the *post-mortem* bivalves stored at different temperatures (5, 15 and 25 °C). Furthermore, the effects of depuration on biological/commercial (index of condition and percentage edibility), physical-chemical (pH and TVB-N), microbiological (TVC, Enterobacteriaceae and psychrotrophic microorganisms) and sensory (raw and cooked specimens) quality parameters of clams stored chilled was studied.

The mortality of non-depurated clams stored chilled followed a logistic model wherein the rate constant ( $r$ ) was  $0.37 \text{ d}^{-1}$  and  $t_{50}=19.3$  dias.

Storage temperature (5-25 °C) did not affect the parameters of biological/comercial quality nor the TVB-N content in post-mortem bivalves but there was reduction in pH of clams stored at 15 °C. The temperature of storage influenced the (exponential) rate constant of TVB-N production (from  $0.012 \text{ h}^{-1}$  at 5 °C up to  $0.103 \text{ h}^{-1}$  at 25 °C).

Seemingly, depuration did not have an effect on the biological/comercial quality of clams but affected the dynamics of pH and TVB-N content (in a lesser degree), and contributed to extend the survival (+3 days with regard to  $t_{50}$ ). In terms of microbiology, the effect of depuration – reducing the microbiological load in 1-2 log(UFC/ml) – was observed during the initial 24-48 h; afterwards, their (exponential) dynamics was analogous. The concentration of microbiology groups assessed herein was over internationally-accepted limits well after  $t_{50}$  or usual period of consumption after *harvest*. Finally, the period of organoleptic acceptance was longer for depurated ( $t_{50}=9.7$  d) than for non-depurated clams ( $t_{50}=5.3$  d and  $t_{50}=7.2$  d, for raw and cooked clams).

**Keywords:** Grooved carpet shell, Depuration, Spoilage, Temperature, TVB-N, Microbiological and sensory quality.

# Índice

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Caracterização da espécie .....	1
1.2. Distribuição Geográfica.....	2
1.3. Importância socioeconómica.....	4
1.4. Composição química e nutricional da espécie.....	5
1.5. Riscos associados ao consumo de moluscos bivalves .....	6
1.6. Deterioração da amêijoia.....	8
1.7. Parâmetros químicos de deterioração .....	9
1.8. Deterioração microbiológica na amêijoia-boa .....	11
1.9. Zonas de produção .....	14
1.10. Depuração .....	16
1.11. Análise Sensorial .....	17
1.12. Objectivos .....	18
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Aquisição das amostras de amêijoia-boa para análise .....	19
2.2. Estratégia do estudo de deterioração da amêijoia-boa e planeamento das experiências .	20
2.2.1. Mortalidade de amêijoas conservadas em refrigeração .....	20
2.2.2. Efeito da temperatura de conservação sobre a variação <i>post-mortem</i> do pH e do teor em ABVT	21
2.2.3. Efeito da depuração sobre a dinâmica da produção de ABVT e sobre alguns grupos da microbiota.....	21
2.2.4. Efeito da depuração sobre as características sensoriais e aceitabilidade de amêijoia-boa.....	22
2.3. Parâmetros indicadores de qualidade e deterioração .....	22
2.3.1. Determinação do pH e parâmetros de qualidade biológica/comercial.....	22
2.3.2. Determinação do teor em Azoto Básico Volátil Total (ABVT).....	23
2.3.3. Determinação de parâmetros microbiológicos.....	25
2.4. Coeficiente térmico Q10.....	30
2.5. Avaliação da mortalidade da amêijoia-boa conservada em refrigeração.....	30
2.6. Análise Sensorial .....	31
2.7. Análise estatística dos resultados.....	33
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
3.1. Estudo da mortalidade de amêijoas não-depuradas conservadas refrigeradas .....	34

<b>3.2.</b>	<b>Efeito da temperatura na deterioração post-mortem de amêijoas-boas não-depuradas</b>	<b>35</b>
3.2.1	Indicadores de qualidade biológica/comercial.....	35
3.2.2	Variação do pH e do teor em ABVT.....	37
<b>3.3.</b>	<b>Estudo comparativo do efeito da depuração sobre a mortalidade.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.</b>	<b>Estudo comparativo do efeito da depuração sobre a dinâmica da qualidade biológica/comercial, do pH, do ABVT e de alguns grupos do microbiota.....</b>	<b>40</b>
3.4.1.	Parâmetros de qualidade biológica/comercial.....	40
3.4.2.	pH e teor em ABVT.....	43
3.4.3.	Determinações microbiológicas.....	44
<b>3.5.</b>	<b>Comparação do efeito da depuração sobre as características sensoriais da amêijoas-boas</b>	<b>47</b>
3.5.1.	Parâmetros de qualidade biológica/comercial.....	47
3.5.2.	Aceitabilidade organolética.....	48
3.5.3.	Descritores organoléticos no momento de rejeição.....	50
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.</b>	<b>Estudo da mortalidade de amêijoas depuradas e não-depuradas conservadas em refrigeração.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.</b>	<b>Efeito da temperatura na deterioração post-mortem de amêijoas-boas não depuradas.</b>	<b>53</b>
<b>4.3.</b>	<b>Comparação do efeito da depuração sobre parâmetros indicadores de qualidade e deterioração .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.</b>	<b>Comparação do efeito da depuração sobre as características sensoriais e aceitabilidade de amêijoas-boas .....</b>	<b>60</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ilustração de <i>Ruditapes decussatus</i> .....	1
<b>Figura 2.</b> Distribuição geográfica da espécie <i>Ruditapes decussatus</i> expressa como probabilidade relativa de ocorrência .....	2
<b>Figura 3.</b> Ria Formosa, Algarve.....	3
<b>Figura 4.</b> Produção aquícola total em Portugal e da amêijoa-boia, <i>Ruditapes decussatus</i> , desde 1999 a 2010 .....	4
<b>Figura 5.</b> Redução bacteriana de óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (I) e desdobramento enzimático endógeno de OTMA em dimetilamina e formaldeído (II). .....	9
<b>Figura 6.</b> Depuradoras DEPURMAR® .....	17
<b>Figura 7.</b> Locais de amostragem (assinalados com marcador amarelo) .....	19
<b>Figura 8.</b> Esquema de Célula de Conway (vista de topo e vista lateral).....	24
<b>Figura 9.</b> Esquema do método utilizado para a contagem de microrganismos viáveis totais (30°C), <i>Enterobacteriaceae</i> e psicotróficos .....	26
<b>Figura 10.</b> Ficha de prova para avaliação sensorial da amêijoa-boia <i>Ruditapes decussatus</i> .....	32
<b>Figura 11.</b> Proporção de "respostas positivas" de espécimes de amêijoa-boia sem depuração ao longo do tempo (dias) .....	34
<b>Figura 12.</b> Variação da percentagem de humidade, do índice da condição e da percentagem de edibilidade e respetivos desvios-padrão nas amêijoas-boas <i>post-mortem</i> sujeitas a diferentes temperaturas de conservação (5 °C, 15 °C e 25 °C) .....	36
<b>Figura 13.</b> Variação do pH e respetivos desvios-padrão nas amêijoas-boas <i>post-mortem</i> expostas a diferentes temperaturas (5°C, 15°C e 25°C) .....	38
<b>Figura 14.</b> Valores médios de ABVT e respetivos desvios-padrão obtidos para amostras de amêijoas-boia (n=3) armazenadas a diferentes temperaturas (5 , 15 e 25 °C) .....	39
<b>Figura 15.</b> Estudo comparativo da mortalidade da amêijoa-boia depurada e não depurada de verão proveniente de viveiro, sendo que as proporções de respostas positivas significam a proporção dos espécimes vivos ao longo do tempo (dias) de ensaio experimental .....	40

<b>Figura 16.</b> Variações médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de humidade (A e B), percentagem de edibilidade (C e D) e índice da condição (E e F) observados ao longo do ensaio experimental.....	42
<b>Figura 17.</b> Variações médias e respectivos desvios-padrão do pH observados ao longo do ensaio experimental em amostras de amêijoas depuradas e não-depuradas .....	43
<b>Figura 18.</b> Variação do ABVT em amêijoa-boa depurada e não-depurada conservada a 5 °C em função do tempo de conservação.....	44
<b>Figura 19.</b> Variação das populações de microrganismos a 30 °C (contagem de microrganismos viáveis totais), <i>Enterobacteriaceae</i> e psicotróficos em amêijoa-boa depurada e não-depurada conservada a 5 °C e respectivos desvios padrão.....	46
<b>Figura 20.</b> Variação (média e respectivos desvios padrão) observada ao longo do ensaio experimental na da percentagem de humidade, percentagem de edibilidade e índice da condição na amêijoa-boa <i>Ruditapes decussatus</i> depurada e não-depurada ..	48
<b>Figura 21.</b> Aceitabilidade em proporções do painel de provadores em relação ao consumo de amêijoas depuradas e não depuradas, cruas e cozidas ao longo do tempo em dias .....	49

## Índice de Quadros

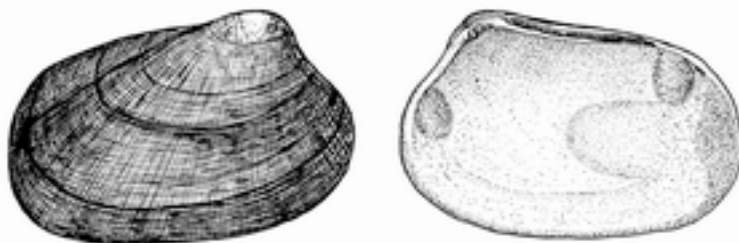
<b>Quadro 1.</b> Valores médios da composição química aproximada e do valor energético da amêijoia-bou em 100 g de produto .....	5
<b>Quadro 2.</b> Critérios utilizados para a classificação das zonas de produção de bivalves . .....	15
<b>Quadro 3.</b> Valores médios ( $\pm$ desvio-padrão) atribuídos a cada um dos descritores quando 50% dos produtores rejeitaram a amostra .....	50

# 1. Introdução

## 1.1. Caracterização da espécie

A amêijoia *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), é um molusco bivalve lamelibrânquio, vulgarmente denominado em Portugal como amêijoia-boia, sendo entretanto conhecida em Espanha como “almeja fina” e em Inglaterra como “grooved carpet shell” (Figura 1) (FAO, 2012). Trata-se de um dos moluscos mais consumidos e rentáveis de zonas costeiras e lagunares no Mediterrâneo, sendo utilizado como fonte de alimentação há séculos (Aníbal et al., 2011).

As populações naturais de *R. decussatus* podem ser encontradas em baías de fundo arenoso ou lodoso ou em zonas costeiras lagunares. A amêijoia-boia pode crescer até 7,5 cm de comprimento, embora os espécimes comercializados, por norma, não atinjam estas dimensões (FAO, 2012).



**Figura 1.** Ilustração de *Ruditapes decussatus* (Fonte: <http://www.fao.org>).

Esta espécie alimenta-se por filtração através dos seus dois sifões (um para entrada de água e outro para a saída) ao nível do substrato. Alimenta-se principalmente de microalgas planctónicas e bentónicas, especialmente diatomáceas, embora muitas vezes se alimente de matéria orgânica (detritos) presente na água (Sobral and Widdows 2000; Almeida and Soares 2012).

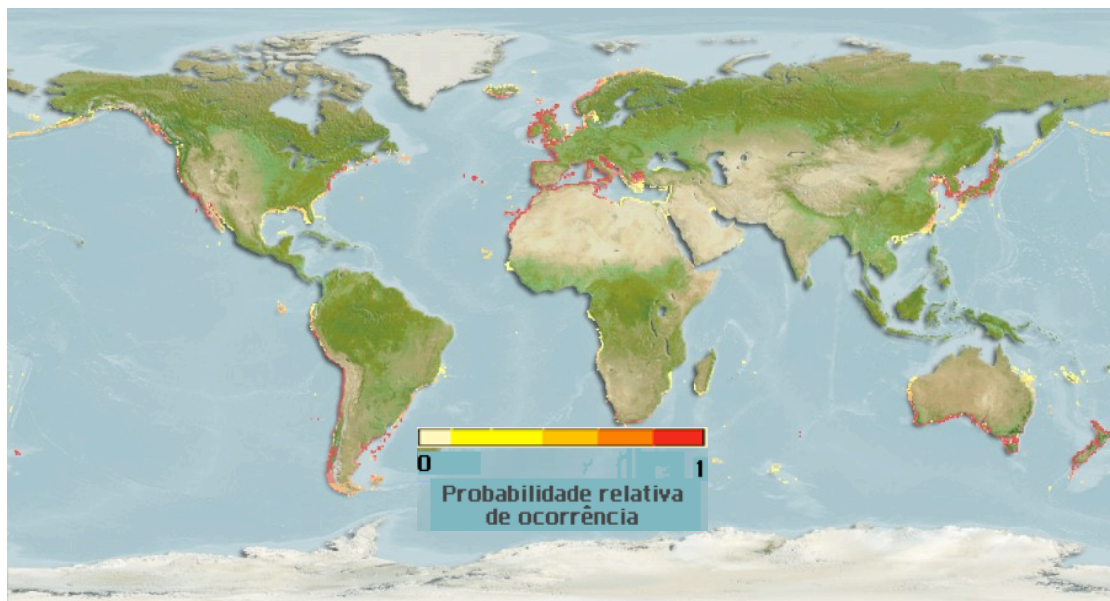
A reprodução é externa e inicia-se nos meses de Maio e Junho prolongando-se pelo Verão, a que se segue um período de repouso no Inverno (Sobral and Widdows,

2000). A espécie tem sexos separados, embora por vezes surjam hermafroditas, embora pouco frequentes (FAO, 2012).

## 1.2. Distribuição Geográfica

A espécie encontra-se distribuída na sua maioria, no Mediterrâneo e Nordeste do Atlântico, desde o Sul de Marrocos ao Sul e Oeste da Inglaterra (Figura 2) (Sobral and Widdows, 1997). De acordo com a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2012) das Nações Unidas os maiores países produtores de amêijoa-boia são Espanha, França, Portugal, Itália e Argélia.

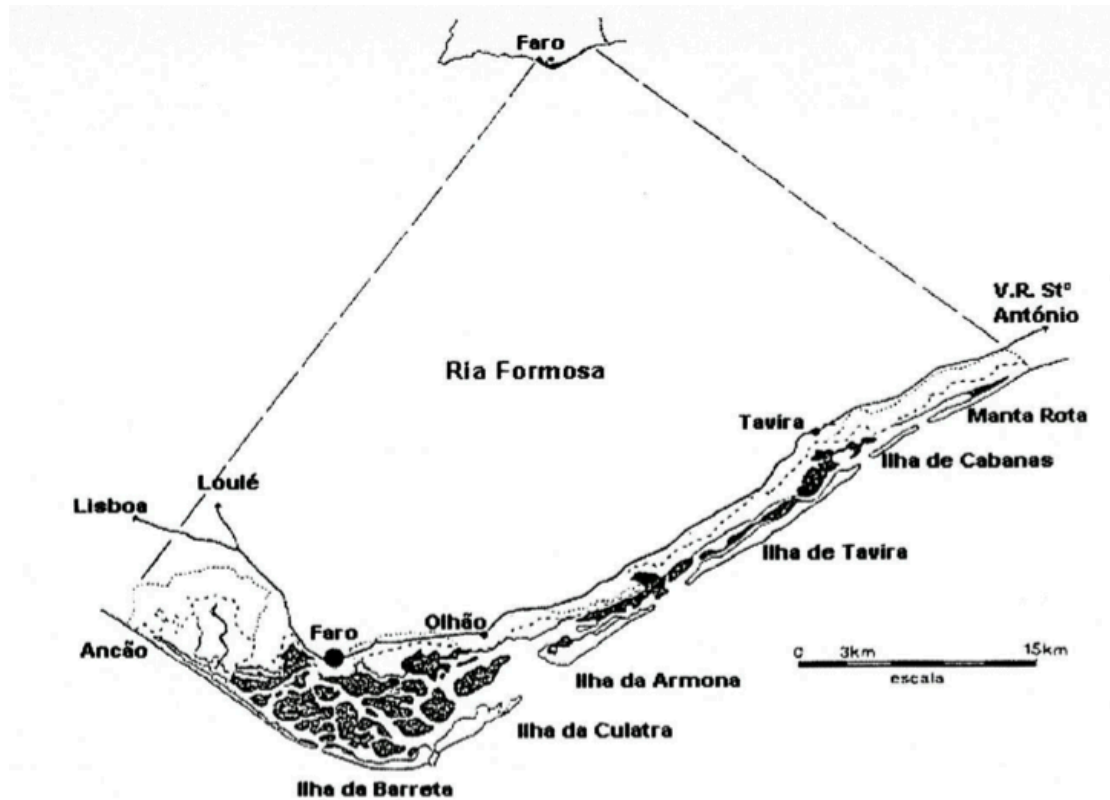
Esta pode ser encontrada na zona intertidal intermédia até a alguns metros fora da costa, enterrada em fundos arenosos ou lodosos entre 15 a 20 centímetros (FAO, 2012; Serdar et al., 2007).



**Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *Ruditapes decussatus* expressa como probabilidade relativa de ocorrência (Fonte:www.sealifebase.org)

Relativamente às amêijoas estudadas e utilizadas neste trabalho, estas provêm da Ria Formosa no Algarve, Portugal. A Ria Formosa é sistema lagunar formado por ilhas barreira localizada no sul de Portugal (36°58'N, 8°02'W até 37°03'N, 7°32'W), que possui 55 km de comprimento e 6 km de largura, no ponto mais largo, e tem uma profundidade média de  $\pm 3$  metros (Bebianno, 1995) (figura 3). A Ria consiste de 14

522 hectares de terrenos húmidos e 4 000 hectares de sapais, bancos de areia expostos e lodo, salinas e viveiros de marisco. Existem seis entradas de água proveniente do Oceano Atlântico no sistema de ilhas barreira da Ria, o que permite que 50% a 75% da água da Ria seja renovada nas marés (Almeida and Soares, 2012).



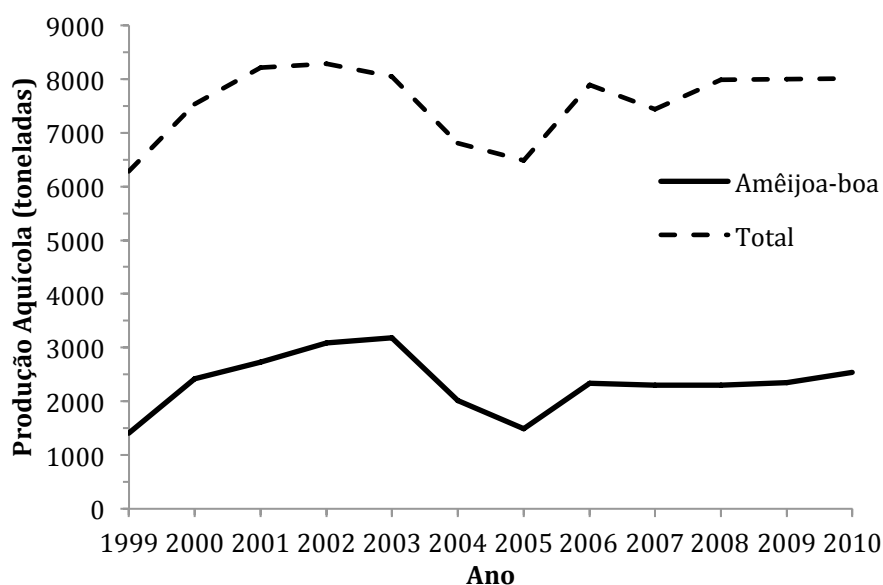
**Figura 3.** Ria Formosa, Algarve (adaptado de Bernardino (2001)). Fonte: Cachola (1997).

Este sistema lagunar é muito produtivo devido aos níveis elevados de nutrientes na água, insolação e às boas trocas de água durante as marés, tornando-se vital para várias espécies aquáticas que aí se reproduzem, incluindo os bivalves. Com estas condições, a Ria Formosa tornou-se um importante local de pesca e produção de marisco em viveiro, sendo economicamente muito importante para a região (Almeida and Soares 2012; Bebianno 1995).

### 1.3. Importância socioeconómica

Os moluscos bivalves têm um papel importante no setor português da pesca e aquicultura, representando uma parte significativa da produção nacional, tanto em termos de quantidade como pelo número de pessoas envolvidas e que dependem da apanha e comercialização.

Em Portugal são comercializadas cerca de 16 espécies de moluscos bivalve vivos provenientes de zonas de produção, entre os quais a amêijoia-boia. Esta é maioritariamente produzida na Ria Formosa no Algarve, sendo que este sistema lagunar com ilhas barreira é o local, em Portugal, onde se concentra a maior produção de moluscos bivalves do país (DGPA, 2007) (Figura 4). A aquicultura e apanha intensiva desta espécie ocorre principalmente na Península Ibérica, França e outros países localizados na bacia do mediterrânico (Range et al., 2011).



**Figura 4.** Produção aquícola total em Portugal e da amêijoia-boia, *Ruditapes decussatus*, desde 1999 a 2010 (adaptado de DGPA (2007) e DGPA (2011)).

A cultura de amêijoia-boia na Ria Formosa é um produto central no quadro socioeconómico da região envolvendo, direta ou indiretamente, 4500 pessoas (INE, 2007). Em 2004, o ICNB confirmou a existência de 1290 viveiros licenciados na Ria Formosa, ocupando uma área intertidal de cerca de  $4,76 \times 10^6$  m<sup>2</sup>. Segundo Aníbal et al., (2011), em 2007, o relatório nacional de produção anual reportou que esta espécie chegou a atingir as 2000 toneladas, valor que representa 27% do total dos produtos do

mar produzidos em Portugal, dos quais cerca de 90% foi proveniente da Ria Formosa. A esses valores oficiais da produção ficam a faltar os números de amêijoas capturadas de forma ilegal por mariscadores e pescadores oportunistas que não possuem licenças e que deste modo não reportam os números capturados, acreditando-se que os valores possam ser o dobro dos que são oficialmente apresentados pelas identidades.

Os moluscos bivalves em Portugal são muito apreciados, fazendo parte integrante da gastronomia típica portuguesa com pratos bastante conhecidos como por exemplo a Amêijoas à Bulhão Pato.

#### 1.4. Composição química e nutricional da espécie

A composição química e nutricional da amêijoas-boa varia de acordo com a época do ano e ainda com o local em que é capturada. A temperatura é também um factor chave no ciclo reprodutivo da *Ruditapes decussatus*, influenciando diretamente a composição bioquímica e nutricional da espécie. Isto ocorre devido à amêijoas-boa recorrer, nesta época, a maior quantidade de hidratos de carbono, proteínas, lípidos e minerais presumivelmente para o desenvolvimento das gónadas (Aníbal et al., 2011).

O valor nutricional e as características organolépticas na amêijoas-boa resultam da sua constituição em proteínas, lípidos, minerais e glicogénio, conjuntamente com compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (Orban et al., 2006).

Segundo Aníbal et al., (2011) o conteúdo em hidratos de carbono varia conforme a estação do ano, apresentando valores de 0,4% em Janeiro e 2,6% em Setembro. Ao nível do conteúdo total de azoto, este varia significativamente ao longo dos meses, apresentando os valores mais elevados em Junho, Agosto e Setembro ( $\approx 1,5\%$ ). Nos valores da constituição proteica obtidos por Aníbal et al. (2011), estes foram mais elevados durante os meses de verão em contraste com os meses de inverno.

**Quadro 1.** Valores médios da composição química aproximada e do valor energético da amêijoas-boa em 100 g de produto (adaptado de Bandarra et al., (2004)).

Valor energético (kcal/kJ)	Parte edível (%)	Gordura total (g)	Colesterol (mg)	Proteína (g)
58,1/243,0	27	0,9	44,0	11,7

Além do apreciado sabor da amêijoia-bou, o interesse por este organismo deve-se também ao seu valor nutricional. No quadro 1 podemos encontrar uma compilação dos valores médios da composição química e valor energético da parte edível (conjunto do miolo e líquido intervalvar).

### **1.5. Riscos associados ao consumo de moluscos bivalves**

O consumo de amêijoia-bou e em geral todos os moluscos bivalves apresentam riscos, estes provêm essencialmente da quantidade de contaminantes que estão associados aos locais onde os moluscos bivalves habitam, podendo ser contaminantes microbiológicos, biológicos ou químicos. Este perigo de possível intoxicação alimentar nos seres humanos ocorre pois os bivalves são animais filtradores, filtrando tudo o que as águas em seu redor transportam. No caso da amêijoia-bou estas podem tornar-se extremamente perigosas visto terem a capacidade de viver e sobreviver com grandes quantidades de contaminantes na água à sua volta, acumulando estas substâncias nocivas para os humanos nos seus tecidos (Almeida and Soares, 2012).

Visto os moluscos bivalves serem consumidos inteiros (não eviscerados) e somente sofrerem uma breve cozedura (de facto, quando submetidos a períodos mais longos de cozedura conferem aos espécimes uma consistência semelhante a borracha, tornando-se desagradável para os consumidores), o risco de contaminação aumenta dado que alguns microrganismos suportam temperaturas elevadas durante pequenos períodos de tempo. A contaminação microbiológica das águas pode resultar de vários factores, nomeadamente da atividade urbana, agroindustrial e de lazer. Quanto às fontes de contaminação fecal, estas podem ser de dois tipos, difusas ou pontuais tendo normalmente uma origem humana e/ou animal (IPIMAR, 2006). É, por isso, importante existirem entidades competentes, para controlar a qualidade das águas onde são produzidos estes animais.

Em Portugal, o Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas – INIAP/IPIMAR (atualmente Instituto Português do Mar e da Atmosfera I.P., IPMA) é a autoridade nacional competente para a classificação e controlo das zonas de produção de bivalves, realizando a monitorização das microalgas tóxicas e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves.

A pluviosidade é um dos factores que mais influência tem na contaminação dos

meios aquáticos chegando mesmo a poder influenciar na classificação do estatuto do local, embora a existência de microrganismos no meio aquático proveniente de fontes de contaminação dependem também de outros fatores, como por exemplo a topologia dos terrenos e as características hidrográficas e vários fatores humanos. As temperaturas da água são importante fator, afetando as concentrações da microflora na água (Abeyta, 2009).

Outro dos riscos associados ao consumo de moluscos bivalves são o facto de estes poderem acumular biotoxinas que provocam graves perturbações gastrointestinais (DSP), neurológicas (PSP) e amnésicas (ASP). Estas biotoxinas acabam por estar associadas a fenómenos de multiplicação rápida e excessiva de microalgas (fitoplâncton) designadas como *blooms*, sendo que estes fenómenos se devem a variações nas condições ambientais (Abeyta, 2009; Lund et al., 2000).

As toxinas podem provocar a morte a alguns animais marinhos, ou manter-se acumuladas nos bivalves e peixes, tornando-se especialmente perigosas, pois estas toxinas são resistentes ao processo de depuração e ao calor utilizado na cozedura destes animais podendo causar sérios problemas de saúde (Egmond et al., 2004).

Outra das formas conhecidas de contaminação das águas que aumentam os riscos no consumo de bivalves é a contaminação química, isto ocorre por contacto da água com substâncias orgânicas e inorgânicas. De entre as substâncias capazes de contaminar quimicamente encontram-se, o alumínio, cádmio, chumbo, lítio e mercúrio. Estes elementos em quantidades elevadas no organismo podem provocar várias alterações no sistema cardiovascular, respiratório e mesmo no sistema nervoso central, sendo que algumas destas substâncias podem ter implicações para os seres vivos ao nível mutagénico e cancerígeno (El-Shenawy, 2004; Ozelik et al., 2011). Estes contaminantes são distribuídos no ambiente pelos ciclos biogeoquímicos, ocorrendo bioacumulação destes elementos quando, durante estes ciclos, a taxa de ingestão do poluente excede a taxa de eliminação (Silva and Batista, 2008).

No Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e no Regulamento (CE) n.º 629/2008 da Comissão Europeia de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, são apresentados valores obtidos através de estudos realizados sobre o grau de exposição do Homem a esses elementos que não

podem ser ultrapassados para se considerar o alimento saudável para o consumo humano.

### **1.6. Deterioração da amêijoia**

As alterações bioquímicas e microbianas que se verificam na amêijoia-boia após a morte dependem muito de fatores que afetam a concentração de substratos e metabolitos nos tecidos, atividade de enzimas endógenas e contaminação microbiana (Sikorski et al., 1990).

A amêijoia-boia é um produto alimentar comercializado vivo, sendo capturada, acondicionada e transportada de forma a não causar um stress excessivo no organismo. Dependendo das zonas de produção, os espécimes devem ir ou não para centros de depuração que posteriormente fazem a distribuição para o comércio. Deste modo, as amêijoas passarão pelo menos entre 24 horas a 48 horas a "depurar" não obtendo qualquer alimento, sendo colocadas à venda um ou dois dias após a saída do organismo do seu habitat. Embora a depuração reduza significativamente o número de microrganismos presentes nas amêijoas (Bernardino, 2001), estas continuam a ter microrganismos. Após serem adquiridas pelo consumidor não houver uma conservação em condições que inibem o crescimento microbiano (por exemplo, refrigeração a 5 °C) de se multiplicar rapidamente, a microbiota aumentará levando a amêijoia a morrer e a deterioração dar-se muito rapidamente visto o animal já estar muito contaminado com microrganismos.

O metabolismo dos compostos azotados após o *rigor mortis* é o principal responsável pela perda da frescura e pelo aparecimento de sinais de putrefação em pescado (Levin, 2010). A amêijoia-boia é sensível tanto à deterioração enzimática como à microbiana, devido à sua concentração elevada de compostos azotados não-proteicos, originando compostos sensorialmente inaceitáveis, como os compostos aromáticos voláteis e a alteração parcial de proteínas. Inicialmente, a deterioração é um processo enzimático endógeno, onde ocorre a autólise. Posteriormente dá-se a deterioração microbiana que leva ao estado final de decomposição (Levin, 2010).

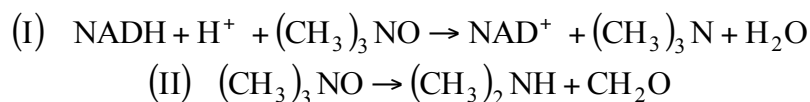
## 1.7. Parâmetros químicos de deterioração

As aminas biogénicas são compostos azotados básicos formados principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou pela aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas. Estas aminas são bases orgânicas com baixo peso molecular e sintetizadas por metabolismos microbianos, vegetais e animais (Santos, 1996).

A descarboxilação de aminoácidos é a forma mais comum da síntese de aminas em produtos alimentares. Estas adquirem o nome de aminas biogénicas quando são formadas pela ação de microrganismos através do processo de descarboxilação (Shalaby, 1997). Estas substâncias são tóxicas, podendo causar doença no ser humano ou mesmo nos animais em caso de ingestão de produtos contendo aminas biologicamente ativas. Os fatores que influenciam a formação de aminas biogénicas em produtos alimentares incluem a disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismos capazes de descarboxilar aminoácidos e as condições favoráveis para o crescimento dos microrganismos e produção das suas enzimas (Shalaby, 1997).

Segundo (Santos, 1996), a presença de aminas biogénicas em concentrações acima de certos valores são consideradas como indicadores de actividade microbiana indesejável, sendo esses valores usados como indicadores de deterioração.

O pescado e seus subprodutos possuem, geralmente, tecidos ricos em óxido de trimetilamina (O-TMA), composto químico envolvido na regulação da pressão osmótica. A partir do momento da morte do pescado, os óxidos de trimetilamina são reduzidos por ação bacteriana a trimetilamina (TMA), que confere o cheiro característico a peixe em deterioração. A trimetilamina, por sua vez, é reduzida enzimaticamente a dimetilamina (DMA) e formaldeído (Figura 5) (Santos, 1996).



**Figura 5.** Redução bacteriana de óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (I) e desdobramento enzimático endógeno de OTMA em dimetilamina e formaldeído (II) (adaptado de (Lagartinho, 2010)).

Estas têm sido vastamente utilizadas como indicadores de frescura em pescado marinho, embora também se possam encontrar outras aminas biogénicas presentes em organismos marinhos (Rawles et al., 1996). Uma forma de estimar a quantidade

(total) de aminas biogénicas numa amostra de pescado é determinar o azoto básico volátil total (ABVT), pois este engloba as várias aminas azotadas presentes.

O regulamento (CE) n.º 2074/2005 do Parlamento Europeu e da Comissão de 5 de Dezembro de 2005 estabelece as medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e para organização de controlos oficiais ao abrigo dos Regulamentos (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e altera os Regulamentos (CE) n.º 853/2004 e (CE) n.º 854/2004. Este Regulamento indica, no capítulo I da secção II do anexo II, que se o exame organolético suscitar dúvidas quanto à frescura dos produtos da pesca, devem ser colhidas amostras que serão submetidas a testes laboratoriais para determinação dos teores de azoto básico volátil total, sendo que os valores não devem ultrapassar os seguintes limites:

1. 25 mg de azoto por 100 gramas de tecido muscular para as espécies *Sebastes* spp., *Helicolenus dactylopterus*, *Sebastichthys capensis*.
2. 30 mg de azoto por 100 gramas de tecido muscular para as espécies pertencentes à família *Pleuronectidae* (à excepção do alabote: *Hippoglossus* spp.).
3. 35 mg de azoto por 100 gramas de tecido muscular para as espécies pertencentes à família *Merluccidae*, família *Gadidae* e o *Salmo salar*.

De qualquer forma, não existem limites estabelecidos para bivalves ou, aliás, para outros grupos que não os peixes.

Diversos métodos analíticos foram utilizados nos últimos anos para a quantificação de azoto básico volátil total (ABVT), sendo que o método de referência descrito no Regulamento (CE) n.º 2074/2005 da Comissão Europeia é o método de destilação de um extrato desproteinizado com ácido perclórico. Os métodos de rotina utilizáveis para controlo dos limites de ABVT de acordo com a Comissão Europeia são os seguintes:

- Método de microdifusão descrito por Conway e Byrne;
- Método de destilação directa descrita por Antonacopoulos;

- Método de destilação de um extracto desproteínizado com ácido tricloroacético [Comité do *Codex Alimentarius* para o peixe e os produtos da pesca (1968)].

A Norma Portuguesa NP 2930 (IPQ, 1988)<sup>1</sup> indica, como método de referência, o método de microdifusão de Conway e Byrne, obedecendo à diretiva da Comissão Europeia, para a determinação do ABVT dos produtos da pesca e aquicultura.

O método de microdifusão de Conway é um método frequentemente utilizado para avaliar a qualidade de alimentos de origem animal com baixo teor em gordura e elevado conteúdo proteico, que permite separar as bases voláteis presentes na amostra através da difusão das mesmas, sendo que estas acabam por ser absorvidas numa solução adequada (ácido bórico) e quantificadas posteriormente através de titulação com ácido clorídrico (HCl). Segundo o Regulamento (CE) n.º 2074/2005, capítulo III da secção II, anexo II, o método é aplicável a produtos da pesca que possuam concentrações de ABVT compreendidas entre 5 e 100 mg N/100g.

A determinação do ABVT é um método que permite estabelecer se o pescado está ou não apto para consumo. Segundo (Baixas-Nogueras et al., 2002), o valor de ABVT para o pescado e produtos da pesca, no qual se inclui a amêijoia-boia *Ruditapes decussatus*, a partir do qual se considera o produto impróprio para consumo é de 35 mg N/100g.

### **1.8. Deterioração microbiológica na amêijoia-boia**

A deterioração dos alimentos é um processo complexo, perdendo-se todos os dias grandes quantidades de produtos alimentares devido à deterioração provocada pela ação microbiana, mesmo nos dias que correm, com inúmeras técnicas avançadas de conservação de alimentos (Gram et al., 2002).

Os microrganismos são a maior causa de deterioração na maioria dos produtos do pescado, no entanto alguns grupos microbianos designados organismos deterioradores específicos (Specific Spoilage Organisms, SSO) são os principais responsáveis pelo desenvolver do sabor e cheiro desagradável associado à deterioração dos produtos da pesca (Gram and Dalgaard, 2002).

---

<sup>1</sup> Entretanto atualizada (em alguns pormenores): NP 2930:2009 (Ed.2).

A deterioração nos produtos alimentares é caracterizada por qualquer alteração que o produto apresente ao consumidor características consideradas inaceitáveis de um ponto de vista sensorial, podendo ser desde danos físicos no produto, mudanças químicas (oxidação e mudanças de cor), ou mesmo o aparecimento de cheiros desagradáveis e sabores estranhos resultantes do crescimento microbiano e dos seus metabolismos (Gram et al., 2002).

O tempo necessário para a deterioração do pescado ocorrer depende principalmente da temperatura de armazenamento e da espécie em questão. Inicialmente, a perda de qualidade no pescado após a morte dá-se devido a alterações autolíticas, nomeadamente a degradação de nucleótidos resultante da ação de enzimas autolíticas, que levam à perda de nucleótidos como a inosina monofosfato (IMP) resultando na perda do sabor a pescado fresco. Apesar destas alterações, a mudanças autolíticas contribuem principalmente para a deterioração, pois ao longo da sua ação disponibilizam catabolitos para o crescimento microbiano (Gram and Huss, 1996).

O pescado fresco caracteriza-se por ter um curto tempo de prateleira e é tipicamente deteriorado por bactérias aeróbicas Gram-negativas (Emborg et al., 2002).

Os moluscos bivalves, devido à sua forma de alimentação, podem acumular microrganismos como bactérias patogénicas e/ou vírus, quando o seu habitat é poluído, apresentando desta forma graves riscos para a saúde dos consumidores (El-Shenawy, 2004).

Apesar de existir uma grande variação na microbiota presente nos vários produtos do pescado, estes podem ser categorizados em grupos com ecologia microbiana similar durante o seu tempo de conservação útil, visto a microbiota se alterar devido às diferentes capacidades dos microrganismos tolerarem as condições de armazenamento. Assim sendo, bactérias Gram-negativas fermentativas (como o género *Vibrionaceae*) são principalmente contaminantes de pescado não sujeito a refrigeração nem a outro método de conservação, enquanto pescado sujeito a refrigeração estão mais susceptíveis a exposição de bactérias Gram-negativas psicrotolerantes (*Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp.) (Gram and Dalgaard, 2002).

Deste modo, são vários os microrganismos ou grupos destes que são utilizados como indicadores de contaminação de pescado. A contagem de microrganismos viáveis totais é um dos testes microbiológicos mais comuns a nível alimentar, pois dá-nos uma estimativa do número total de unidades formadoras de colónias viáveis e

cultiváveis. Esta contagem é muito útil para se entender a qualidade sanitária do produto, pois a presença de um número elevado de microrganismos mesófilos aeróbios que crescem bem a temperaturas próximas dos 37 °C (temperatura corporal dos seres humanos) pode ser indicador de qualidade higiênica deficiente. Embora seja uma determinação importante, é necessário ter em conta que esta determinação não é específica para um simples grupo de microrganismos mas sim para todos os que se encontram no produto, sendo que alguns desses microrganismos fazem parte da microbiota natural do alimento ou então são simplesmente um indicador de uma alteração incipiente e não um potencial perigo (Abeyta, 2009).

Em produtos alimentares que são conservados refrigerados, a deterioração é produzida essencialmente por microrganismos psicotróficos, sendo possível obter análises com valores próximos entre microrganismos mesófilos e psicotróficos, pois muitas das bactérias capazes de crescer em condições de temperatura entre os 0 e os 7 °C são mesófilos facultativos (Gram and Huss, 1996).

Outro grupo de microrganismos indicadores de possível contaminação (fecal) é o das *Enterobacteriaceae*, uma vasta família de bacilos Gram-negativas que inclui uma grande variedade de bactérias patogénicas. Os integrantes desta família são bastante conhecidos, sendo que alguns fazem parte da microbiota normal do trato digestivo de seres humanos e de outros animais, como é o caso de *Escherichia coli*, sendo que outros podem ser encontrados nos solos ou na água ou ainda outros que são conhecidos por estarem implicados em vários processos patogénicos, como por exemplo o caso dos géneros *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (Crowley et al., 2005; Joosten et al., 2008; Ruby and Ingham, 2009). Todas as enterobactérias são anaeróbias facultativas e possuem exigências nutricionais simples, fermentando glicose e produzindo ácido a partir dessa reação. Estas bactérias possuem catalase e citocromo oxidase e todas elas reduzem nitrato a nitrito e não formam esporos (Ruby and Ingham, 2009). Estas podem causar graves infecções no trato respiratório inferior, infecções abdominais, do trato urinário, de tecidos moles, do sistema nervoso central, oftalmológicas e de ossos e articulações (Paterson, 2006).

Devido a existência de *Enterobacteriaceae* nas fezes humanas, como é o caso de *Escherichia coli*, têm sido usados como indicadores da qualidade da água, visto que normalmente não se multiplicam na água, especialmente se o nível de matéria orgânica não for elevado (Ruby and Ingham, 2009).

No caso da amêijoia-boia, a deterioração está bastante relacionada com a natureza da microbiota e níveis de contaminação presente tanto no organismo como também das águas de onde a amêijoia é proveniente. Se análises à água apontarem grandes quantidades de microrganismos de origem fecal, as amêijoas também estarão muito contaminadas. Devido aos procedimentos e aos "correntes" métodos microbiológicos, torna-se impraticável a sua utilização no controlo de qualidade do pescado, pois na maioria dos casos, os resultados só estariam disponíveis após o fim do período de conservação útil do pescado comercializado fresco.

A carga microbiana existente no pescado tem efeito direto na qualidade do produto ao longo do tempo, pois com o passar do tempo alguns grupos microbianos começam a proliferar acabando por atingir valores inaceitáveis para consumo, visto muitos destes microrganismos serem patogénicos. Porém, é através de métodos indirectos, como a determinação de compostos azotados ou da análise sensorial que é possível controlar a qualidade do pescado.

### **1.9. Zonas de produção**

O consumo de bivalves pode acarretar riscos para a saúde pública, devido ao seu tipo de alimentação praticado por estes organismos (filtração) e aos locais em que habita. Para o controlo da qualidade dos bivalves comercializados existe um programa de monitorização no qual se determina a qualidade das zonas lagunares e litorais portuguesas onde existe produção e apanha dos moluscos bivalves.

Os surtos de infeções e toxinfecções pelo consumo de moluscos bivalves é recorrente ao longo dos últimos anos. Isto ocorre devido a contaminação dos bivalves com microrganismos patogénicos bacterianos e virais ou com biotoxinas marinhas (IPIMAR, 2006). Em Portugal, o controlo da salubridade sobre a produção e colocação no mercado de bivalves vivos é realizado pelo IPIMAR (sob delegação da Direcção-Geral de Veterinária).

A monitorização incide principalmente sobre dois perigos para a saúde pública: a contaminação dos bivalves com biotoxinas marinhas e a contaminação microbiológica, sendo que esta última é causadora de doenças infecciosas, como a febre tifoide, cólera, disenteria, hepatites e gastroenterites. A monitorização, que ocorre mensalmente, inclui a fixação da localização e dos limites das zonas de

produção de bivalves (ZPB) e a sua classificação em categorias (Quadro 2), de acordo com os teores bacteriológicos, o que permite avaliar o grau de contaminação e o tratamento que será necessário para que os bivalves possam ser comercializados.

No Algarve, a monitorização microbiológica das zonas de produção de bivalves incide sobre os estabelecimentos licenciados (viveiros), localizados nas zonas intertidais da Ria Formosa e da Ria de Alvor, sendo a amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) uma das espécies de referência (IPIMAR, 2006).

A legislação em vigor relativa ao controlo de salubridade dos bivalves destinados ao consumo humano, nomeadamente o Decreto-Lei no 293/98 de 18 de Setembro (AR, 1998), transposição da Diretiva no 91/492/CEE, do Conselho, de 15 de Julho de 1991 (CE, 1991), e o Regulamento (CE) no 854/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 (CE, 2004), baseia-se no pressuposto de que o estado de salubridade do ambiente determina o estado de salubridade do produto final, o que pressupõe que a monitorização inclua não só a detecção e quantificação de microrganismos indicadores de contaminação fecal, mas também o reconhecimento das fontes de poluição de origem humana ou animal que possam constituir uma fonte de contaminação para a zona de produção de bivalves (IPIMAR, 2006).

**Quadro 2.** Critérios utilizados para a classificação das zonas de produção de bivalves (adaptado de IPIMAR, 2006).

<b>Categoria</b>	NMP de coliformes fecais/100g de carne e líquido intravalar	Tipo de tratamento
<b>A*</b>	Todas as amostras <math> < 3 \times 10^2 </math>	Os bivalves podem ser apanhados e colocados no mercado para consumo humano direto, após certificação em centros de expedição.
<b>B</b>	90% das amostras <math> < 6 \times 10^3 </math>	Os bivalves podem ser apanhados, mas só podem ser colocados no mercado após tratamento em centros de depuração ou após transposição para uma zona que permita a descontaminação.
<b>C</b>	Todas as amostras <math> < 6 \times 10^4 </math>	Os bivalves podem ser apanhados, mas só podem ser colocados no mercado após transposição durante, pelo menos, dois meses, combinada ou não com uma depuração.
<b>Proibida</b>	>math> > 6 \times 10^4 </math>	A apanha de bivalves é totalmente proibida.

\* Ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de carne e líquido intravalar de molusco.

## 1.10. Depuração

A depuração é um processo que surgiu da necessidade de tornar salubre um organismo, neste caso a amêijoia-boa, através da sua estabulação por um determinado período de tempo, em tanques onde circula água salgada limpa, eliminando desta forma microrganismos patogénicos acumulados (Maffei et al., 2009; Ruano et al., 1998).

Os bivalves ao alimentarem-se por filtração acabam por ingerir certos materiais inertes e outros incapazes de serem digeridos, sendo eliminados em forma de pseudofeces. A restante parte é ingerida acabando por entrar no trato gastrointestinal para digestão e absorção, sendo aqui que se concentra a componente microbiana da dieta (Maffei et al., 2009).

O processo da depuração baseia-se no fornecimento de água estéril, com salinidade e temperatura adequada por períodos de 24 a 48 horas. Os bivalves são imersos e espalhados no fundo dos tanques para a eficiência do processo ser maior, fazendo com que haja uma maior facilidade na libertação da fracção bacteriana concentrada nos órgãos do trato digestivo. Os microrganismos patogénicos que se encontram retidos nas brânquias são arrastados pelo fluxo de água. O processo de depuração não deve exceder 48 horas, pois coloca em risco a sobrevivência dos organismos vistos estes não serem alimentados no processo de depuração.

Os organismos provenientes de zonas classificadas como C requerem uma transposição de pelo menos 2 meses para uma zona classificada como A ou B, podendo ser necessário a realização de depuração ou não (IPIMAR, 2006).

É de salientar que a depuração não elimina biotoxinas ou contaminações com metais pesados, servindo apenas para reduzir a carga bacteriana para níveis considerados aceitáveis, sendo que a única solução para eliminar estes perigos para a saúde pública é através da interdição da apanha nas zonas afetadas (IPIMAR, 2006).

Atualmente existem 3 métodos de esterilização da água usados nos centros de depuração, o uso de cloro, ozono e radiação ultra violeta. O cloro e o ozono são dois tratamentos que atuam a nível químico na água e ambos funcionam devido ao seu elevado poder oxidativo que promove a inativação de toda a matéria orgânica presente na água (Ruano et al., 1998). A radiação ultravioleta, por outro lado, atua a nível físico nos agentes bacterianos. A radiação provoca a destruição irreversível do DNA das células bacterianas levando à sua morte. Este método é dos mais

frequentemente encontrados nos centros de depuração, embora seja ligeiramente mais rentável o uso de ozono. Todos estes processos de esterilização da água apresentam vantagens e desvantagens cabendo aos responsáveis do centro de depuração estudar qual o processo que será mais eficaz e rentável no seu caso.

Maioritariamente, os tanques de depuração utilizados possuem dimensões semelhantes a "arcas frigoríficas" (2m x 1m x 1m) e funcionam com sistema fechado de circulação de água e utilizam radiação ultravioleta para eliminar carga microbiana (Figura 6).



**Figura 6.** Depuradoras DEPURMAR®.

**Fonte:** <http://www.dgrm.minagricultura.pt/xportal/xmain?xpid=dgrm&xpgid=genericPage&conteudDetalhe=169541&actualmenu=168428>

### 1.11. Análise Sensorial

A análise sensorial é o mais corrente (e importante) método na avaliação de frescura no pescado. É uma disciplina da Ciência usada na análise, medição e interpretação de características de alimentos através dos sentidos da visão, olfato, tacto, paladar e audição (Barbosa and Vaz-Pires, 2004; Ozogul, 2010).

No pescado e seus subprodutos ocorrem várias alterações sensoriais ao longo da sua deterioração, tais como a aparência, odor, sabor e textura. À medida que os produtos vão perdendo a "frescura inicial" e alguns desses parâmetros se alteram significativamente, o que torna a avaliação sensorial um método bastante efetivo para

a avaliação da frescura e qualidade do pescado, sendo por isso utilizado pelos serviços de inspeção e controlo no setor das pescas (Olafsdóttir et al., 1997).

Embora não seja comum a realização de métodos de análise da frescura na amêijoa-boia, visto ser capturada, tratada em centro de depuração (dependendo da classificação da zona de produção) e colocada no circuito comercial 1 a 3 dias pós-captura, viva, as alterações a nível da frescura/perda de qualidade após períodos prolongados de conservação poderão ser avaliados usando métodos de Análise Sensorial. Gonçalves, (2010) propôs um esquema de avaliação sensorial de amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*), tanto para amêijoa-boia cozida como crua, utilizando escalas categóricas.

### **1.12.Objectivos**

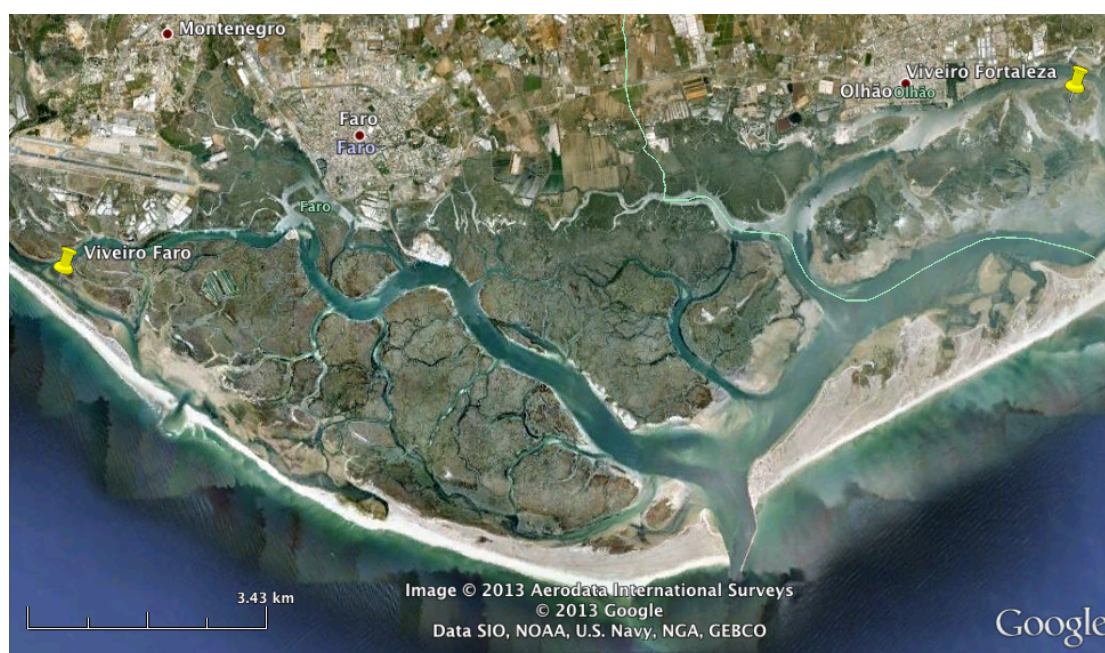
O objetivo geral deste trabalho foi estudar a deterioração da amêijoa-boia *Ruditapes decussatus*, depurada e não depurada, comercializada e conservada em refrigeração de acordo com o procedimento corrente no circuito comercial. Especificamente pretendeu-se:

1. Examinar a mortalidade de amêijoas não-depuradas conservadas em refrigeração;
2. Estudar o efeito da temperatura de conservação sobre a dinâmica de ABVT em amêijoa-boia num período *post-mortem*.
3. Analisar e comparar os efeitos da depuração vs. não-depuração sobre a mortalidade e sobre parâmetros de qualidade biológica/comercial (índice de condição e percentagem de edibilidade), físico-química (pH e ABVT), microbiológica (contagem de microrganismos viáveis/cultiváveis totais, Enterobacteriaceae e psicotróficas) e sensorial (aceitabilidade e uma série de descritores) de amêijoa-boia conservada em refrigeração;
4. Relacionar os parâmetros estudados com limites legais e/ou propostos por organizações internacionais e, eventualmente, propor a sua revisão;

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Aquisição das amostras de amêijoas-boas para análise

Para os ensaios experimentais foi utilizada amêijoas-boas *Ruditapes decussatus* proveniente de dois locais distintos da Ria Formosa, Algarve. As amêijoas utilizadas no estudo da mortalidade natural (Inverno) e no estudo da conservação de amêijoas-boas no período *post-mortem* a diferentes temperaturas (v. a seguir), foram adquiridas diretamente a um produtor com viveiro na Ria Formosa, com localização próxima da Ilha de Faro (Latitude 37° 0' 1.22" N; Longitude 7° 58' 44.72" W) (figura 4). As amostras para o estudo do efeito da depuração, a nível químico, físico e microbiológico foram adquiridas no centro de depuração "Edgar Mariscos" em Olhão, sendo provenientes de um viveiro na zona da Fortaleza (Ria Formosa) (figura 7).



**Figura 7.** Locais de amostragem (assinalados com marcador amarelo).

As amostras foram adquiridas e imediatamente transportadas (em mala térmica refrigerada) para os laboratórios do Departamento de Engenharia Alimentar (DEA), do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve em embalagens de plástico idênticas às usadas no circuito comercial. As experiências iniciaram-se sempre no momento da chegada das amostras ao DEA.

## **2.2. Estratégia do estudo de deterioração da amêijoa-boia e planeamento das experiências**

O trabalho experimental foi planeado para ser sequencial. Deste modo, foi possível realizar três ensaios experimentais ao longo do inverno, época na qual não ocorre reprodução, nem desenvolvimento das gónadas na amêijoa-boia pelo que não se esperam diferenças na composição bioquímica das amêijoas (Sobral and Widdows, 1997). Os restantes ensaios experimentais realizados (análise sensorial, mortalidade natural com amêijoas de Verão) foram realizados numa época quente no fim da Primavera e início do Verão tendo-se de considerar diferenças na parte edível das amêijoas (*vulgo* “miolo”) em comparação com as que foram utilizadas nos ensaios no Inverno. Assim sendo, as experiências foram realizadas de modo a obterem-se dados que demonstrem o que se obtém em época fria e o que se obtém em época quente.

Nos ensaios principais, em que se determinaram parâmetros de condição biológica (percentagem edibilidade e índice da condição), parâmetros físico-(bio)químicos (pH e ABVT) e microbiológicos, as determinações químicas e físicas foram realizadas sempre entre as 9 e 13 horas dos dias de amostragem, sendo que as determinações microbiológicas se iniciavam imediatamente a seguir e até o procedimento estar concluído.

### **2.2.1. Mortalidade de amêijoas conservadas em refrigeração**

Estudou-se a mortalidade de (n=50) amêijoas não-depuradas provenientes do viveiro próximo a ilha de Faro (Janeiro de 2012) e conservadas refrigeradas ( $5 \pm 1$  °C). Diariamente, avaliou-se a resposta dos espécimes a estímulo mecânico (v. secção 2.5). À variação da percentagem de amêijoas classificadas como vivas com o decorrer do ensaio foi ajustado um modelo logístico (v. secção 2.5).

Noutro ensaio, comparou-se a mortalidade de (n=60) amêijoas, colhidas em viveiro na zona de Fortaleza (Olhão) em Maio 2012 e também conservadas refrigeradas, em que metade foram depuradas (D) e a outra metade não foram depuradas (ND). Para cada um destes grupos, avaliou-se, diariamente, a resposta dos espécimes a estímulo mecânico (v. secção 2.5) e à variação da percentagem de amêijoas classificadas como vivas com o decorrer do ensaio foi ajustado um modelo logístico (v. secção 2.5).

### **2.2.2. Efeito da temperatura de conservação sobre a variação *post-mortem* do pH e do teor em ABVT**

Uma amostra de (n=194) amêijoas não-depuradas foi congelada a -18 °C previamente à realização desta experiência com o propósito de garantir o cariz *post-mortem* desta parte do trabalho. Depois de descongeladas à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, foram divididas em três grupos. Cada grupo foi, então, conservado a diferentes temperaturas, designadamente 5, 15 e 25 °C. As determinações do pH e do teor de ABVT (v. secção 2.3 ) decorreram até à evidente deterioração das amostras, em termos sensoriais e químicos (ABVT>35 mg/100 g), o que ocorreu após distintos períodos – entre as 24 e as 192 horas de conservação. No caso das amêijoas armazenadas a 5 °C em câmara de refrigeração, foram efetuadas determinações do pH e do teor de ABVT no início da experiência (0 h) e após 24, 72, 144 e 192 horas de conservação. Para a temperatura de 15 °C foram realizadas as análises às 0, 24, 30, 48 e 54 horas de conservação. No ensaio a 25 °C, as análises foram executadas às 0, 9, 24 e 31 horas de conservação. Complementarmente à determinação do teor em ABVT, analisaram-se alguns parâmetros indicadores da qualidade biológica/comercial dos espécimes, viz. percentagem de humidade, índice de condição e percentagem de edibilidade (v. secção 2.3.1).

### **2.2.3. Efeito da depuração sobre a dinâmica da produção de ABVT e sobre alguns grupos da microbiota**

Este ensaio experimental foi realizado com (n=720) amêijoas provenientes de viveiro localizado na área designada como Fortaleza na Ria Formosa, em que metade foram sujeitas a depuração (24 h) e outra metade não foram depuradas. Durante o período de conservação a 5 °C, efetuaram-se determinações do pH e do teor de ABVT e de alguns parâmetros microbiológicos (contagem de colónias viáveis totais a 30 °C, de *Enterobacteriaceae* e de microrganismos psicrótróficos; v. secção 2.3.3). De forma a permitir a realização das várias análises, foram amostrados espécimes de amêijoa não-depurada após 0, 42, 234, 474, 522 e 570 h de conservação e de amêijoa depurada após 24, 144, 360, 504 e 552 h de conservação (neste caso, considerou-se como momento de amostragem inicial o instante relativo às amêijoas-não depuradas, visto as amêijoas que sofreram depuração terem ficado 24 h a depurar no centro de depuração e todas as amêijoas serem provenientes do mesmo viveiro e lote).

#### **2.2.4. Efeito da depuração sobre as características sensoriais e aceitabilidade de amêijoas-boas**

Por fim, e com o intuito de descrever as alterações observáveis nos atributos sensoriais amêijoas, depuradas e não-depuradas, conservadas refrigeradas, realizaram-se sessões de prova 1, 2, 3, 7, 11 e 14 dias após início do ensaio) recorrendo a um painel de (n=11) provadores não-treinados mas experientes na avaliação sensorial de produtos alimentares. Nas provas, os provadores analisaram amostras cruas e cozidas, relativamente a uma série de atributos sensoriais e incluindo a resposta a uma questão relativa à aceitabilidade do produto (v. secção 2.6).

### **2.3. Parâmetros indicadores de qualidade e deterioração**

#### **2.3.1. Determinação do pH e parâmetros de qualidade biológica/comercial**

Em cada momento de amostragem foram selecionadas aleatoriamente 10 amêijoas para as determinações que descrevem a seguir.

Cada uma das amêijoas selecionadas foi pesada numa balança Mettler AE240 com precisão de 0,0001 g e medida com uma craveira de precisão (0,05 mm). Após a pesagem e medição das amêijoas, procedeu-se à remoção da parte edível (*vulgo* "miolo") através do corte dos músculos adutores com um bisturi, removendo excesso de humidade das conchas e miolo com papel absorvente antes de se realizarem as pesagens dos indivíduos inteiros, concha e parte edível (*vulgo* "miolo").

Após o processo descrito acima, mediu-se o pH do miolo com um medidor de pH (pH Meter GLP21, Crison, Espanha) equipado com uma sonda para líquidos e, subsequentemente, o *miolo* foi colocado numa estufa a 65 °C durante 24 horas, sendo pesado novamente.

A percentagem de edibilidade (PE) e o índice da condição (IC) de bivalves são há muito usados com objetivos biológicos e comerciais (Lucas and Beninger, 1985; Orban et al., 2006). O índice da condição é comum ser usado como critério de avaliação da qualidade e salubridade para a escolha dos melhores produtos (Orban et al., 2006). O índice da condição (IC) foi calculado através de:

$$IC = \left( \frac{PSM}{PSC} \right) \cdot 1000$$

onde PSM é o peso seco do miolo (g) e PSC é o peso seco da concha (g) (Aníbal et al., 2011; Orban et al., 2006). A percentagem de edibilidade (PE) foi calculada recorrendo-se à fórmula:

$$PE = \left( \frac{PHC}{PT} \right) \cdot 100$$

onde PHC é peso húmido da parte edível (miolo) (g), e PT é o peso total da amêijoas, incluindo a concha (g) (Aníbal et al., 2011; Mohite et al., 2009).

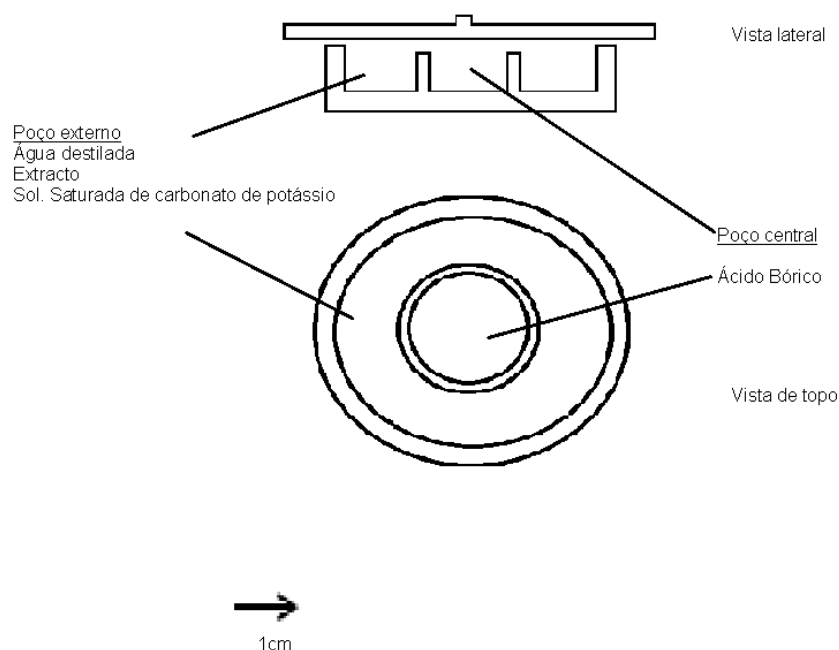
### **2.3.2. Determinação do teor em Azoto Básico Volátil Total (ABVT)**

Para a determinação do teor em ABVT foi usado o método de microdifusão de Conway, método de referencia descrito pela Norma NP 2930 (IPQ, 1988). As soluções utilizadas foram solução de ácido tricloroacético a 5% (m/v), álcool etílico a 95%, solução de hidróxido de sódio 0,1 N, solução de ácido clorídrico 0,02 N, solução de sulfato de amónia a 0,1% (m/v), solução de ácido bórico com indicador e solução saturada de carbonato de potássio. Todas as soluções utilizadas foram preparadas conforme as instruções fornecidas pelas marcas dos reagentes, tendo sido utilizada água destilada e reagentes de qualidade analítica.

As amostras destinadas aos ensaios químicos consistiram em cerca de 30 amêijoas selecionadas aleatoriamente do lote, sendo posteriormente extraído o "miolo" das amêijoas através do corte dos músculos adutores. Após a extração do "miolo", este foi ligeiramente triturado com a ajuda de um bisturi, tendo-se pesado 3 amostras de 10 g para três copos devidamente identificados e de seguida adicionado 20 ml de ácido tricloroacético a 5% (m/v) e homogeneizado (Ultra-Turrax T25 da Janke&Kunkel, IKA-Labotechnik) durante 2 minutos.

O extracto obtido foi então filtrado em papel de filtro Whattman n.º 4 de modo a obter uma solução límpida. Após a obtenção da solução deu-se início à execução do método de Conway para a determinação do ABVT. Este foi esquematizado para possuir uma célula de Conway (Figura 8) representando o branco, um ensaio padrão

(controlo) em duplicado e três amostras em duplicado e consistiu em pipetar para o poço central de todas as célula de Conway 1 ml de ácido bórico à qual foi adicionada indicador verde de bromocresol com vermelho de metilo.



**Figura 8.** Esquema de Célula de Conway (vista de topo e vista lateral).

Na parte exterior da célula do ensaio em branco foi colocado 1,5 ml de água destilada e 1 ml de solução saturada de carbonato de potássio, enquanto que no ensaio padrão (controlo) foi colocado na parte exterior da célula 0,5 ml de água destilada, 1 ml de solução padrão de sulfato de amónia 0,1% e 1 ml de solução saturada de carbonato de potássio e por fim nas células das amostras foi colocado na parte exterior da célula 0,5 ml de água destilada, 1 ml de extrato da amostra filtrada e 1 ml de solução saturada de carbonato de potássio.

Logo após a adição da solução saturada de carbonato de potássio as células de Conway, que previamente os rebordos do poço exterior tinham sido untados com silicone para esmerilados, foram completamente cobertas pelas tampas esmeriladas. As células foram ligeiramente agitadas para ocorrer a mistura das soluções no poço exterior e dar-se o início da volatilização das bases presentes na amostra e colocadas durante hora e meia numa estufa à temperatura de 40 °C.

A determinação do teor das bases voláteis foi realizada através de titulação com ácido clorídrico até ao "aparecimento" de uma solução cor de rosa.

A determinação do ABVT realizada com o método de Conway foi aplicada ao ensaio experimental das amêijoas num período *post-mortem* conservada a diversas temperaturas, sem estarem em gelo, e ao ensaio experimental da análise da deterioração de amêijoa-boa depurada e não depurada, conservada a 5 °C.

### **2.3.3. Determinação de parâmetros microbiológicos**

As análises microbiológicas realizadas neste trabalho foram:

- Contagem de colónias viáveis totais a 30 °C;
- Contagem de *Enterobacteriaceae*;
- Contagem de microrganismos psicotróficos.

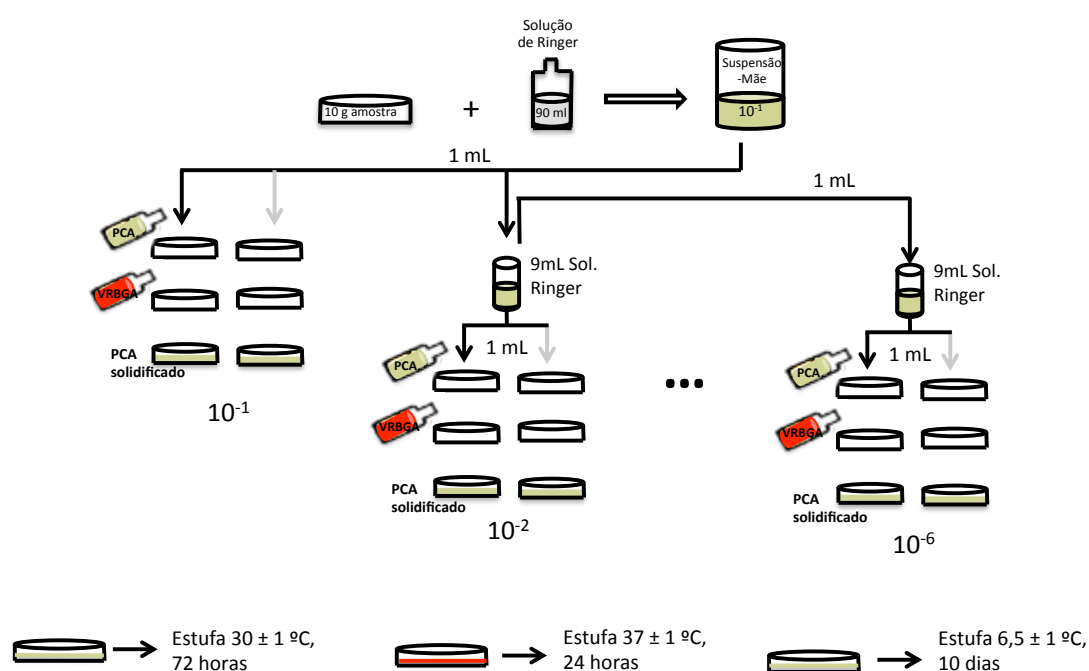
Foram selecionadas aleatoriamente 20 amêijoas em cada momento de amostragem com o objetivo de se obterem 20 g de miolo para análise. A abertura das valvas através do corte dos músculos adutores, perto da chama do bico de Bunsen e com bisturi e pinça esterilizados, permitiu obter amostra em ambiente asséptico. A preparação das amostras foi realizada seguindo a norma internacional ISO 6887-3 (ISO, 2003).

#### **2.3.3.1. Contagem de colónias viáveis totais a 30 °C**

A contagem de colónias de microrganismos a 30 °C (i.e. microrganismos mesófilos aeróbios totais, *vulgo* contagens totais) foi efetuada de acordo com um procedimento adaptado da Norma Portuguesa NP 4405 (IPQ, 2002). O método utilizado baseia-se na sementeira por incorporação de uma quantidade da amostra em meio de cultura apropriado. A incubação das placas semeadas foi realizada a 30 °C durante 72 horas em aerobiose. O cálculo do número de microrganismos viáveis por grama de amostra efetuado a partir do número de colónias obtidas.

Para a preparação da suspensão-mãe, homogeneizaram-se 10 g de amostra e 90 ml de solução de Ringer no homogeneizador Stomacher® (Stomacher®, Worthing, UK), durante mais dois minutos. Após este processo de homogeneização obteve-se a suspensão inicial. A esta suspensão adicionaram-se 90 ml de solução de Ringer, obtendo-se suspensão-mãe ( $10^{-1}$ ). Prepararam-se as diluições decimais seguintes, adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de solução de Ringer, tal como se

ilustra na Figura 9. O número de diluições realizadas foi feito de modo a obterem-se cerca de 150 colónias características por placa. Após a preparação da suspensão-mãe e diluições, procedeu-se à sementeira. Semeou-se 1 ml da suspensão-mãe por placa de Petri, procedendo-se igualmente para as restantes diluições. Por fim, adicionou-se cerca de 15 ml de meio de cultura Plate Count Agar (PCA, Scharlau®) fundido e arrefecido a cerca de 45 °C a todas as placas, tendo-se misturado cuidadosamente o meio e o inóculo. Após a sementeira deixou-se o meio de cultura e inóculo solidificar. Depois de solidificados os meios, incubaram-se as placas de Petri invertidas em estufa a  $30 \pm 1$  °C durante  $72 \pm 3$  h.



**Figura 9.** Esquema do método utilizado para a contagem de microrganismos viáveis totais (30°C), *Enterobacteriaceae* e psicotróficos.

Após as 72 h de incubação contaram-se todas as colónias presentes nas placas que apresentavam entre 15 e 300 colónias. Calculou-se o número de microrganismos (N) presentes na amostra em duas diluições sucessivas de acordo com a seguinte equação (1):

$$N = \frac{\sum C}{v \cdot 1,1 \cdot d}$$

onde  $\sum C$  corresponde à soma das colónias contadas nas duas placas de diluições sucessivas onde, pelo menos numa, contém um mínimo de dez colónias,  $v$  corresponde ao volume de inóculo em cada placa de Petri, expresso em ml e  $d$  corresponde à diluição correspondente à primeira diluição contada.

Os resultados foram expressos com dois algarismos significativos, tendo-se reportado o resultado como UFC/g.

### 2.3.3.2. Contagem de Enterobacteriaceae

A contagem de *Enterobacteriaceae*, isto é, bactérias Gram negativas que fermentam a glucose e que apresentam reação de oxidase negativa, foi realizada conforme a Norma Portuguesa NP 4137 (IPQ, 1991). O método seguido baseia-se na técnica de contagem de colónias características que se multiplicam em meio de cultura sólido contendo biliar, cristal-violeta e glucose (Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA, Scharlau®) e incubado a 37 °C durante 24 h.

A preparação da suspensão-mãe e diluições foi feita pesando-se 10 g da amostra e colocando-se em saco de homogeneizador Stomacher® juntamente com 90 ml de solução de Ringer, homogeneizando de seguida durante 2 minutos no Stomacher®. Deste modo, obteve-se a suspensão-mãe ( $10^{-1}$ ). As diluições decimais seguintes foram preparadas adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de diluente (solução de Ringer). O número de diluições realizado foi feito de modo a ser suficiente para se obterem até 150 colónias características.

Após a preparação da suspensão-mãe e diluições, procedeu-se à sementeira. Semeou-se 1 ml da suspensão-mãe para uma placa de Petri, procedendo-se igualmente para as restantes diluições. Por fim, adicionou-se cerca de 10 ml do meio de cultura VRBGA arrefecido a 45 °C deixando-o solidificar. Após solidificação, adicionou-se uma fina camada adicional de VRBGA (cerca de 5 ml), deixando-a secar.

Incubaram-se as placas de Petri invertidas numa estufa  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 1$  h. Foram contadas como *Enterobacteriaceae* as colónias características com 1-2 mm de diâmetro que apresentaram a cor violeta/rosa e halo da mesma cor. Conforme se propõe na Norma Portuguesa NP 4137 (IPQ, 1991) para a confirmação, selecionaram-se 3 colónias características, tendo-se repicado para meio de cultura de ágar nutritivo.

As placas ficaram a incubar numa estufa a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 1$  h. Após a incubação foram realizados os seguintes testes para confirmação:

- **Teste da Oxidase**

Colocou-se 1 a 2 gotas do reagente da oxidase num papel de filtro e com uma vareta de vidro retirou-se uma colónia, tendo esta sido esfregada no papel de filtro. O teste considerou-se negativo se a cor não mudasse para violeta-escuro em 10 s.

- **Teste da fermentação**

Cada colónia oxidase negativa foi inoculada por método de picada para 2 tubos contendo meio de cultura glucosado. Incubaram-se os tubos a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 1$  h. A contagem foi realizada seguindo a seguinte indicação: a reação é positiva se houver desenvolvimento de cor amarela na totalidade do tubo.

Contabilizaram-se como *Enterobacteriaceae* as colónias que apresentaram resultado para a reação de oxidase negativa e fermentaram a glucose nos tubos com meio glucosado (meio de cultura passa a amarelo quando ocorre a acidificação consequente da fermentação da glucose). Calculou-se o número de *Enterobacteriaceae* (E) usando a seguinte fórmula:

$$E = \frac{b \cdot C}{A}$$

na qual b é o nº de colónias identificadas como *Enterobacteriaceae*, A é o nº de colónias selecionadas para confirmação e C é o nº total de colónias nas placas.

O resultado foi expresso por um número compreendido entre 1,0 e 9,9, multiplicado pela potência de 10 apropriada. Reportou-se o resultado como UFC/g.

### **2.3.3.3. Contagem de microrganismos psicotróficos**

A contagem de microrganismos psicotróficos foi realizada conforme está descrito nas normas internacionais ISO 6887-1 (ISO, 1999) e ISO 17410 (ISO, 2001). O método utilizado baseia-se na inoculação num meio de cultura sólido não-seletivo

uma alíquota. As placas são incubadas a 6,5 °C durante 10 dias em aerobiose. Sendo o cálculo do número de microrganismos viáveis por grama ou mililitro de amostra a partir do número de colónias obtidas.

A preparação da suspensão-mãe e diluições foi feita pesando-se 10 gramas da amostra e colocando-se em saco de homogeneizador Stomacher® juntamente com 90 ml de solução de Ringer, homogeneizando de seguida durante 2 minutos no Stomacher®. Deste modo, obteve-se a suspensão-mãe ( $10^{-1}$ ). As diluições decimais seguintes foram preparadas adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de diluente (solução de Ringer). O número de diluições realizado foi feito de modo a ser suficiente para obter até 150 colónias características.

Após a preparação da suspensão-mãe e diluições, procedeu-se à sementeira, semeando-se 1 ml da suspensão-mãe para uma placa de Petri já com o meio de cultura sólido, procedendo-se de igual modo com as restantes diluições, deixando-se secar no fim. As placas de Petri foram incubadas invertidas em estufa a  $6,5 \pm 1$  °C durante 10 dias.

Após os 10 dias, contaram-se todas as colónias presentes nas placas que apresentavam menos de 150 colónias. Os resultados foram considerados válidos nas placas de Petri que apresentassem pelo menos 15 colónias. Calculou-se o número de microrganismos (N) presentes na amostra em duas diluições sucessivas de acordo com a seguinte equação:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

onde  $\sum C$  corresponde à soma das colónias contadas nas duas placas de diluições sucessivas onde , pelo menos numa, contém um mínimo de quinze colónias, V corresponde ao volume de inóculo em cada placa de Petri, expresso em ml, d corresponde à diluição correspondente à primeira diluição contada,  $n_1$  corresponde ao número de placas contadas na primeira diluição e  $n_2$  corresponde ao número de placas contadas na segunda diluição.

Os resultados foram expressos com dois algarismos significativos, reportando o resultado como UFC/g. Também foi tido em conta que se em duas placas de diluição correspondente não houver colónias presentes, reporta-se o resultado como  $< 1/(V \cdot d)$  microrganismos psicotróficos por ml ou por g, onde V é o volume do

inóculo aplicado a cada placa de Petri em ml; e d é o factor de diluição da suspensão inicial ou diluição inoculada.

#### **2.4. Coeficiente térmico Q<sub>10</sub>**

A temperatura é um factor extremamente importante e afeta numerosos processos biológicos e fenómenos associados como a deterioração de produtos alimentares. Um dos vários indicadores usados para descrever o efeito da temperatura nos processos biológicos é o coeficiente térmico Q<sub>10</sub>, que é o rácio de incremento de um determinado parâmetro de um processo biológico em consequência do aumento de temperatura em 10 °C, neste caso o processo biológico é a taxa de aumento de ABVT (Xiao, 2000). Por cada aumento de 10 °C na temperatura, supõe-se que a taxa estudada duplica, resultando numa curva exponencial num gráfico onde se marcam a taxa *versus* a temperatura (Begon et al., 2006; Valiela, 1995).

Determinou-se o coeficiente térmico Q<sub>10</sub> relativo ao incremento da taxa de produção do ABVT dos filetes ao longo do tempo. Calculou-se o Q<sub>10</sub> (v. a seguir) através da divisão dos valores obtidos de taxa de incremento de ABVT nas três temperaturas (5, 15 e 25 °C) testadas (v. ponto anterior). Com base nas taxas obtidas para aquelas temperaturas, calcularam-se os/dois valores de Q<sub>10</sub>, mais especificamente o valor entre 5 e 15 °C e 15 e 25 °C através da equação:

$$Q_{10} = \left[ \frac{r_1}{r_2} \right]^{\frac{10}{(t_1 - t_2)}}$$

em que r<sub>1</sub> e r<sub>2</sub> são as taxas de incremento de ABVT às temperaturas t<sub>1</sub> e t<sub>2</sub> (Begon et al., 2006).

#### **2.5. Avaliação da mortalidade da amêijoas-boas conservada em refrigeração**

Durante o período de conservação das amêijoas a 5 °C – simulando as condições de comercialização e/ou conservação pelo consumidor final (em frigorífico) – avaliou-se, diariamente, a resposta individual das amêijoas a estímulo mecânico. Essa resposta foi classificada numa das seguintes categorias:

1. Espécime fecha valvas rapidamente - reação rápida;
2. Espécime fecha valvas lentamente - reação lenta;

3. Não reage (mas não está aberta) - sem reação, mas valvas fechadas;
4. Concha claramente aberta (morta) - sem reação e valvas claramente abertas.

Neste trabalho consideram-se como “respostas positivas” as três primeiras categorias que correspondem aos espécimes vivos.

A dinâmica da mortalidade das amêijoas foi descrita recorrendo ao modelo logístico:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-r(t-t_{50})}}$$

em que P corresponde à proporção de espécimes classificados como vivos (i.e. classificados nas categorias 1-3), r é a taxa de mortalidade, t se refere ao tempo de amostragem (em dias) e  $t_{50}$  refere-se ao tempo (em dias) que decorreu até que metade dos espécimes fosse classificados na categoria 4.

## 2.6. Análise Sensorial

Identificaram-se várias características sensoriais cuja alteração ao longo do processo de deterioração poderia ser avaliada por um painel de provadores (n=11), nomeadamente ao nível do olfato, aspeto e cor. Assim, utilizou-se uma escala de classificação, adaptada de Gonçalves (2010) e Meilgaard et al. (1999), de seis pontos, de 0 (ausente), 1 (muito fraco), 2 (fraco), 3 (médio), 4 (médio a intenso) a 5 (intenso), para avaliar o aspeto e a intensidade do cheiro da parte edível (cf. ficha de prova como a que se apresenta na figura 10). Inicialmente, foram registadas todas as alterações sensoriais observadas na amêijoa durante a sua deterioração, tais como o cheiro a fresco (maresia, algas), cheiro amoniacal e/ou sulfídrico/pútrido, brilho da superfície, cor creme-marfim (nacarada), cor branca (leitosa) e/ou amarelada/acastanhada. Adicionalmente, solicitou-se a cada provador que respondesse se, nesse momento, consumiria as amêijoas.

Nome:

Data:

Hora:

*Instruções*

- 1) Avalie as duas amostras relativamente ao aspecto/cor e cheiro, utilizando a tabela fornecida com categorias de intensidade;
- 2) Classifique o cheiro e aspecto/cor de cada amostra segundo a escala de intensidades seguinte, anotando na tabela os códigos das amostras que recebeu;

Parâmetros		Intensidade (categorias)					
		0 Ausente	1 Muito Fraco	2 Fraco	3 Médio	4 Médio a intenso	5 Intenso
Cheiro	Fresco, característico a bivalves, algas, maresia						
	Amoniacal						
	Sulfídrico, pútrido						
Aspecto/Cor (parte edível)	Brilho da superfície *						
	Cor creme-marfim, nacarada						
	Cor branca, leitosa						
	Cor amarelada, acastanhada						

\* 0 - Baça, opaca a 5 - Muito brilhante

Consumiria?	Sim	Não

**Figura 10.** Ficha de prova para avaliação sensorial da amêijoia-boia *Ruditapes decussatus*.

Para a análise dos resultados elaboraram-se "curvas de aceitabilidade" i.e. representou-se graficamente a variação ao longo do tempo da experiência da

proporção de provadores que afirmava consumir as amêijoas (P). À curva foi ajustado o modelo logístico:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-r(t-t_{50})}}$$

em que  $t_{50}$  se refere ao tempo (em dias) no qual metade dos provadores não consumiria os bivalves. Para descrever as qualidades sensoriais da amêijoia depurada e não-depurada e crua e cozida nesse instante ( $t_{50}$ ), obtiveram-se as médias e respectivos desvios-padrão dos parâmetros/descriptores sensoriais.

## 2.7. Análise estatística dos resultados

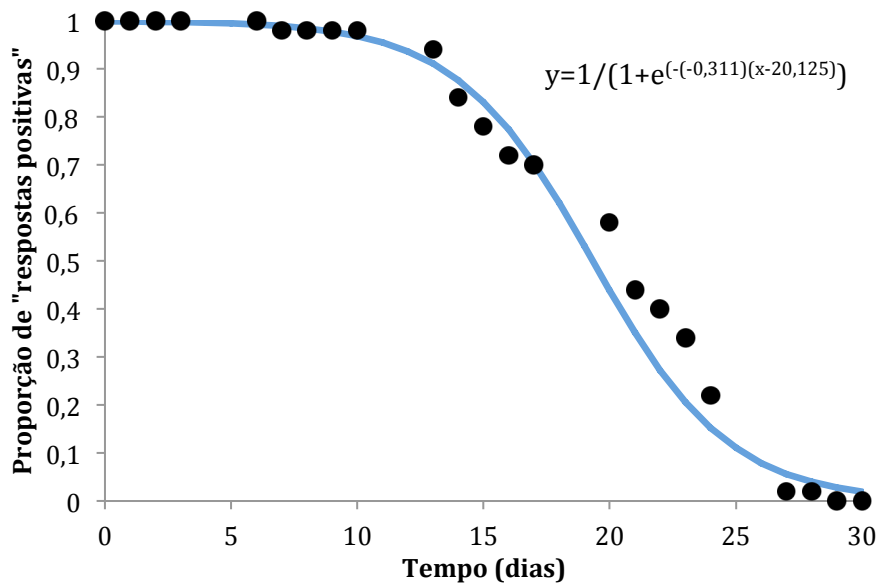
Os resultados apresentam-se como média  $\pm$  desvio-padrão (estatística descritiva) ou estimativa  $\pm$  erro-padrão (modelos de regressão). Considerou-se um nível de significância de 5%.

A dinâmica do teor em ABVT (modelo exponencial e exponencial com *offset*) assim como da mortalidade ou da aceitabilidade (modelo logístico) foi estudada através de regressão não-linear simples (método de Levenberg-Marquardt) recorrendo ao *software* IBM® SPSS® Statistics 21 (IBM Corp., EUA). A significância das estimativas dos parâmetros e o ajuste dos modelos de regressão obtidos foram avaliados através dos erros-padrão/intervalos de confiança e do coeficiente de determinação  $R^2$ , respetivamente.

### 3. Resultados

#### 3.1. Estudo da mortalidade de amêijoas não-depuradas conservadas refrigeradas

No estudo da mortalidade da amêijoas não-depurada proveniente de viveiro sobre "dinâmica logística" segue uma curva de sobrevivência sigmoide (Figura 11).



**Figura 11.** Proporção de "respostas positivas" de espécimes de amêijoas sem depuração ao longo do tempo (dias).

Na Figura 11, é exibida uma representação gráfica dos valores obtidos da mortalidade "natural" para amêijoas não-depuradas. Entende-se por proporção de "respostas positivas" a proporção de amêijoas vivas num dado momento da amostragem, sendo que esta proporção começa a diminuir ao sétimo dia, nesse momento, registaram-se os primeiros casos de espécimes com classificação 4 (morte).

O ensaio terminou ao 30º dia, altura em que se verificou que todos os indivíduos envolvidos no ensaio obtiveram classificação 4. Os dados obtidos permitiram o ajuste ao modelo logístico, de equação  $y = \frac{1}{1 + e^{(-r \times (t - t_{50})}}$ , em que  $r = -0,311 (\pm 0,019)$  e o  $t_{50} = 20,125 (\pm 0,216)$  dias. Após ca. 20 dias, estima-se que 50% dos espécimes se encontrem mortos.

## **3.2. Efeito da temperatura na deterioração post-mortem de amêijoas-boas não-depuradas**

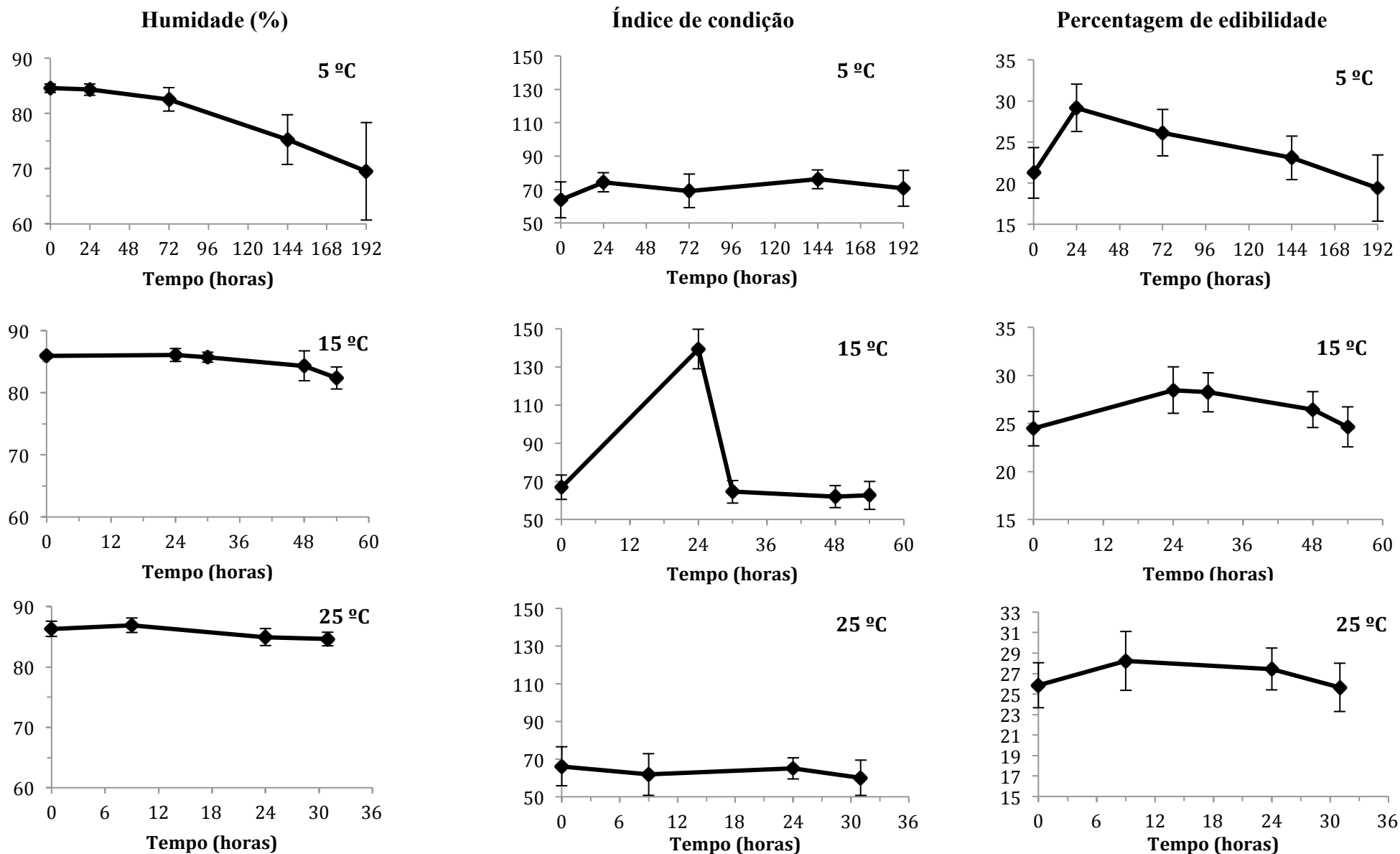
### **3.2.1 Indicadores de qualidade biológica/comercial**

Na figura 12, é possível observar as variações da percentagem de humidade ao longo do tempo que durou a experiência.

Nos vários tratamentos realizados foi possível verificar que a percentagem de humidade das amêijoas se manteve próximo dos 85%. Este facto só não ocorreu no tratamento de 5 °C no qual aquela percentagem diminuiu para ca. 70%. Quanto aos dois tratamentos restantes os valores mantiveram-se próximos do valor inicial e nunca desceram abaixo dos 80% de humidade, sendo que a 25 °C a percentagem de humidade diminuiu menos de 2% mantendo valores bastante semelhantes aos apresentados pelas amêijoas inicialmente.

Quanto ao índice da condição, pode-se observar na figura 12 que os valores não variaram significativamente ao longo do tempo, exceptuando o ensaio realizado a 15°C em que se obteve na amostragem após 24 um valor muito/demasiado elevado em comparação com todos os outros momentos de amostragem, cerca de 72 unidades superior aos restantes valores.

A percentagem de edibilidade (figura 12) aumentou nas primeiras horas do ensaio, embora não tão acentuado nas amostras sujeitas a 15 °C e 25 °C como na amostra que esteve a 5 °C. Nesta última, o aumento pode-se considerar relativamente importante, de cerca de 8%, mais concretamente de 21,3% a 29,2%, enquanto que no ensaio a 15 °C o aumento foi de apenas 4% (24,5% a 28,5%) e no ensaio de 25 °C o aumento foi ainda menor, aproximadamente 2% (25,9% a 28,2%). Após este aumento inicial, verifica-se uma diminuição da percentagem de edibilidade, sendo que o maior decréscimo se verificou no ensaio a 5°C, decrescendo de 29,2% até 19,4% quase de forma linear. Os decréscimos verificados nas outras duas condições térmicas não se revelaram tão acentuados, embora seja possível ver na figura 12 que a tendência, com o passar do tempo, é a diminuição da percentagem de edibilidade.



**Figura 12.** Variação da percentagem de humidade, do índice da condição e da percentagem de edibilidade e respetivos desvios-padrão nas amêijoas-boas *post-mortem* sujeitas a diferentes temperaturas de conservação (5 °C, 15 °C e 25 °C).

### 3.2.2 Variação do pH e do teor em ABVT

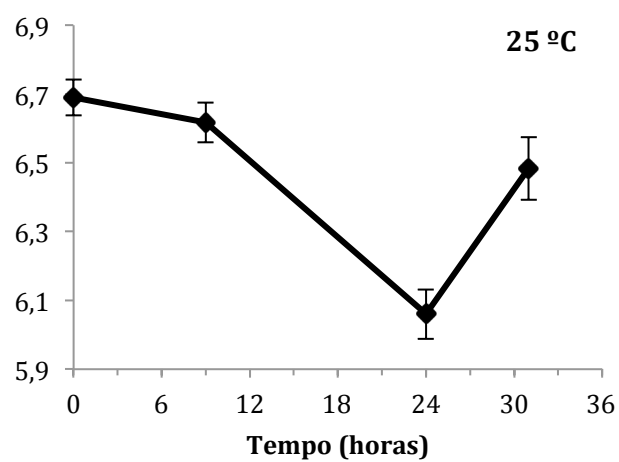
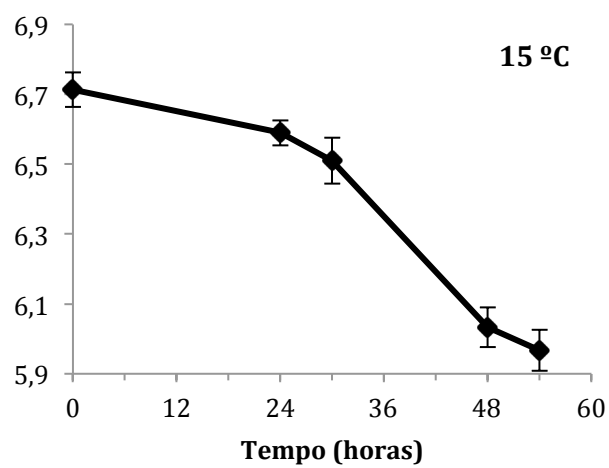
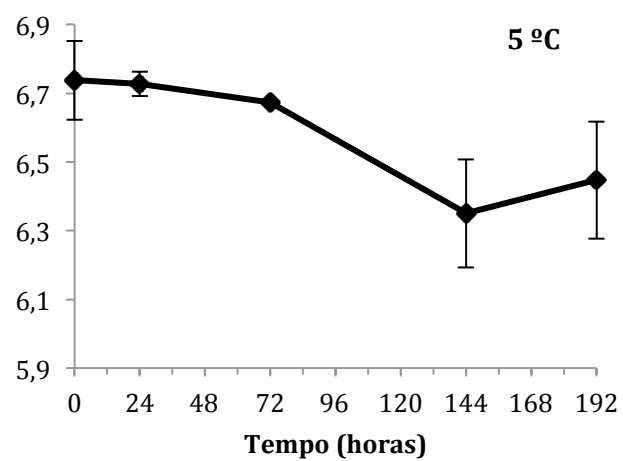
Relativamente ao pH, é possível verificar (figura 13) que inicialmente o valor médio de pH é quase idêntico nos três tratamentos e que os limites dos respetivos desvios padrão estão sobrepostos, mas com o decorrer do tempo notam-se ligeiras diferenças nos valores médios obtidos. A figura mostra, de certa forma, um padrão que ocorre ao longo do tempo, havendo inicialmente um decréscimo de pH e, posteriormente, um aumento. Este padrão só não foi observado nas amostras tratadas a 15°C, embora o último ponto de amostragem tenha apresentado um valor de pH muito próximo do penúltimo ponto.

De qualquer forma, os valores obtidos e as variações verificadas ao longo do ensaio não apresentaram diferenças muito significativas, tendo os valores de pH variado entre 5,97 e 6,74. Os valores de pH iniciais foram os mais elevados, encontrando-se sempre próximo do 6,7, enquanto o valor de pH mais baixo verificado (5,97) ocorreu no tratamento de 15 °C às 54 horas de ensaio.

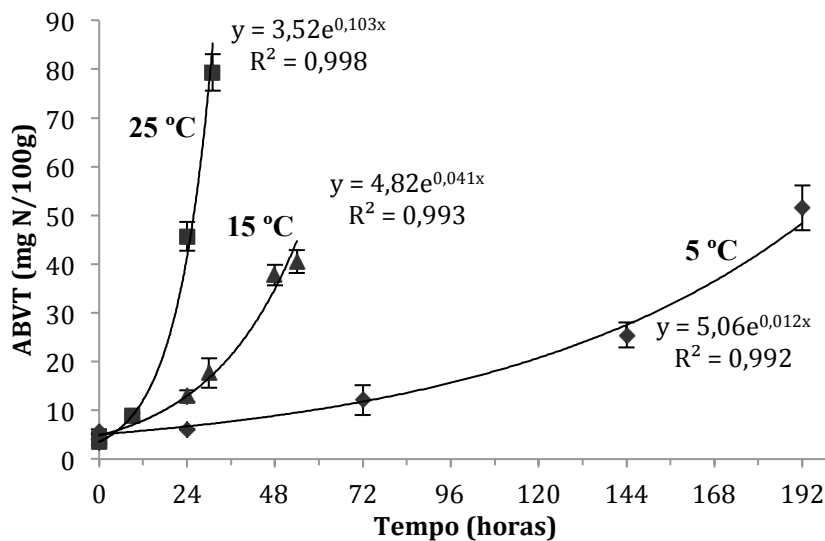
Na figura 14 representam-se graficamente os valores médios de ABVT obtidos ao longo do tempo para amostras de amêijoas-boas expostas a diferentes temperaturas (5, 15 e 25 °C). É possível observar que quanto mais elevada é a temperatura mais rápido os valores de ABVT aumentaram, revelando uma deterioração, ou perda de frescura, mais acelerada.

No ensaio realizado a 5 °C, a amêijoas-boas apresentou um ABVT com resultado médio inicial de cerca de 5,5 mg N/100g, enquanto nos ensaios realizados a 15 e 25 °C obtiveram-se 4,7 mg N/100g e 3,5 mg N/100g, respetivamente. Todos estes valores sofreram um incremento exponencial durante o tempo em que a experiência se desenvolveu até atingirem os valores máximos registados, de 51,5 mg N/100g ao fim de 192 h (8 dias) de experiência no caso dos 5 °C, de 40,5 mg N/100g ao fim de 54 h na experiência a 15 °C e 79,3 mg N/100g às 31 h do ensaio a 25 °C.

A dinâmica da variação de ABVT foi descrita por modelos exponenciais para as três temperaturas, cujos coeficientes de determinação  $R^2$  foram bastante elevados,  $>0,99$ .



**Figura 13.** Variação do pH e respectivos desvios-padrão nas amêijoas-boas *post-mortem* expostas a diferentes temperaturas (5°C, 15°C e 25°C).

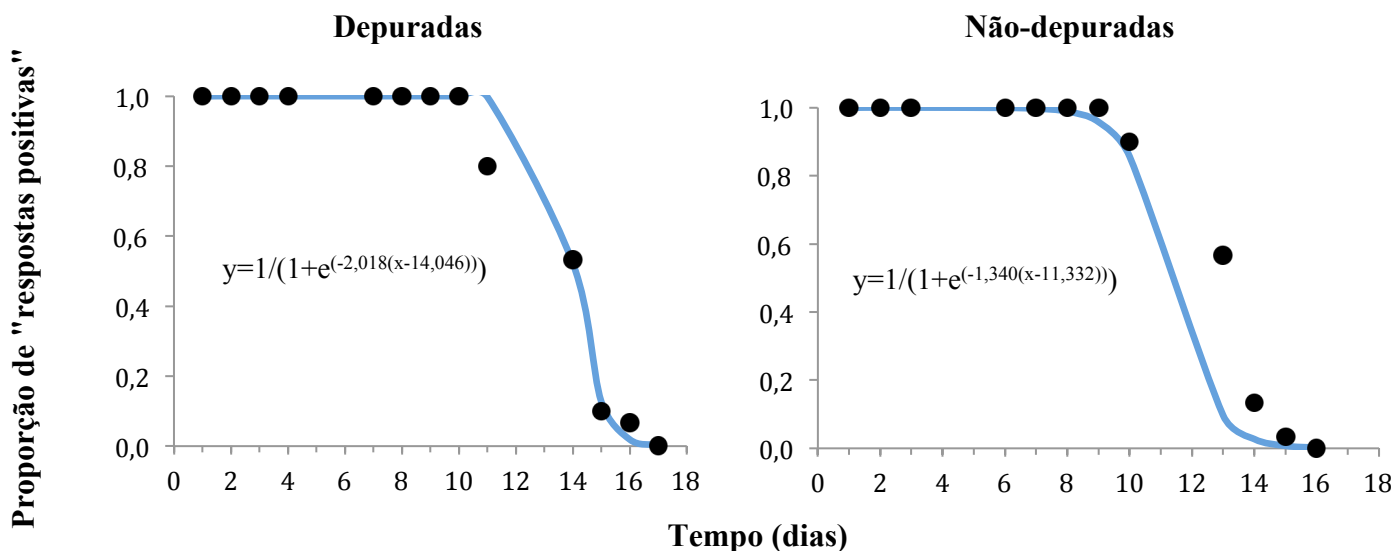


**Figura 14.** Valores médios de ABVT e respectivos desvios-padrão obtidos para amostras de amêijoas-boas (n=3) armazenadas a diferentes temperaturas (5 , 15 e 25 °C).

As taxas de aumento de ABVT estimadas para cada uma das temperaturas estudadas, aumentam com a temperatura. No ensaio realizado a 5 °C obteve-se uma taxa de 0,012 h<sup>-1</sup>, enquanto que a 15 °C se obteve uma taxa de 0,041 h<sup>-1</sup> e por fim a 25 °C a taxa foi de 0,103 h<sup>-1</sup>. A dinâmica observada pode ser descrita resumidamente através do coeficiente Q<sub>10</sub> que vale 3,44 entre os 5 °C e os 15 °C e 2,49 entre os 15 °C e os 25 °C.

### 3.3. Estudo comparativo do efeito da depuração sobre a mortalidade

No ensaio experimental em que se utilizaram amêijoas provenientes de viveiro depuradas e não-depuradas para estudo comparativo da respectiva mortalidade, foi possível observar que até ao nono/décimo dia nada se alterou, encontrando-se a totalidade de amêijoas vivas (Figura 15). A partir do momento em que se registou a primeira morte, tanto nas amêijoas depuradas como as não-depuradas, o aumento da mortalidade foi considerável visto que em cinco dias (do décimo ao décimo quinto dia de amostragem) a mortalidade registada era já muito próxima dos 100%: no caso das amêijoas depuradas o valor da proporção de respostas positivas encontrava-se nos 0,10 e nas amêijoas que não sofreram depuração, 0,03.



**Figura 15.** Estudo comparativo da mortalidade da amêijoas-depurada e não-depurada de verão proveniente de viveiro, sendo que as proporções de respostas positivas significam a proporção dos espécimes vivos ao longo do tempo (dias) de ensaio experimental.

A experiência terminou somente com um dia de diferença: as amêijoas-depuradas sobreviveram durante mais tempo, 17 dias em comparação com as amêijoas não-depuradas, cujo registro da última morte foi ao 16º dia.

Numa perspectiva mais quantitativa e analisando a Figura 15, é possível verificar que o modelo logístico se ajusta claramente aos dados obtidos. As estimativas dos respectivos parâmetros foram bastante semelhantes:  $r = -2,018 (\pm 0,577)$  e  $t_{50} = 14,046 (\pm 0,118)$  para amostras de amêijoas-depuradas e no caso da amostra não-depurada,  $r = -1,340 (\pm 0,257)$  e  $t_{50} = 11,332 (\pm 0,157)$ .

### 3.4. Estudo comparativo do efeito da depuração sobre a dinâmica da qualidade biológica/comercial, do pH, do ABVT e de alguns grupos do microbiota

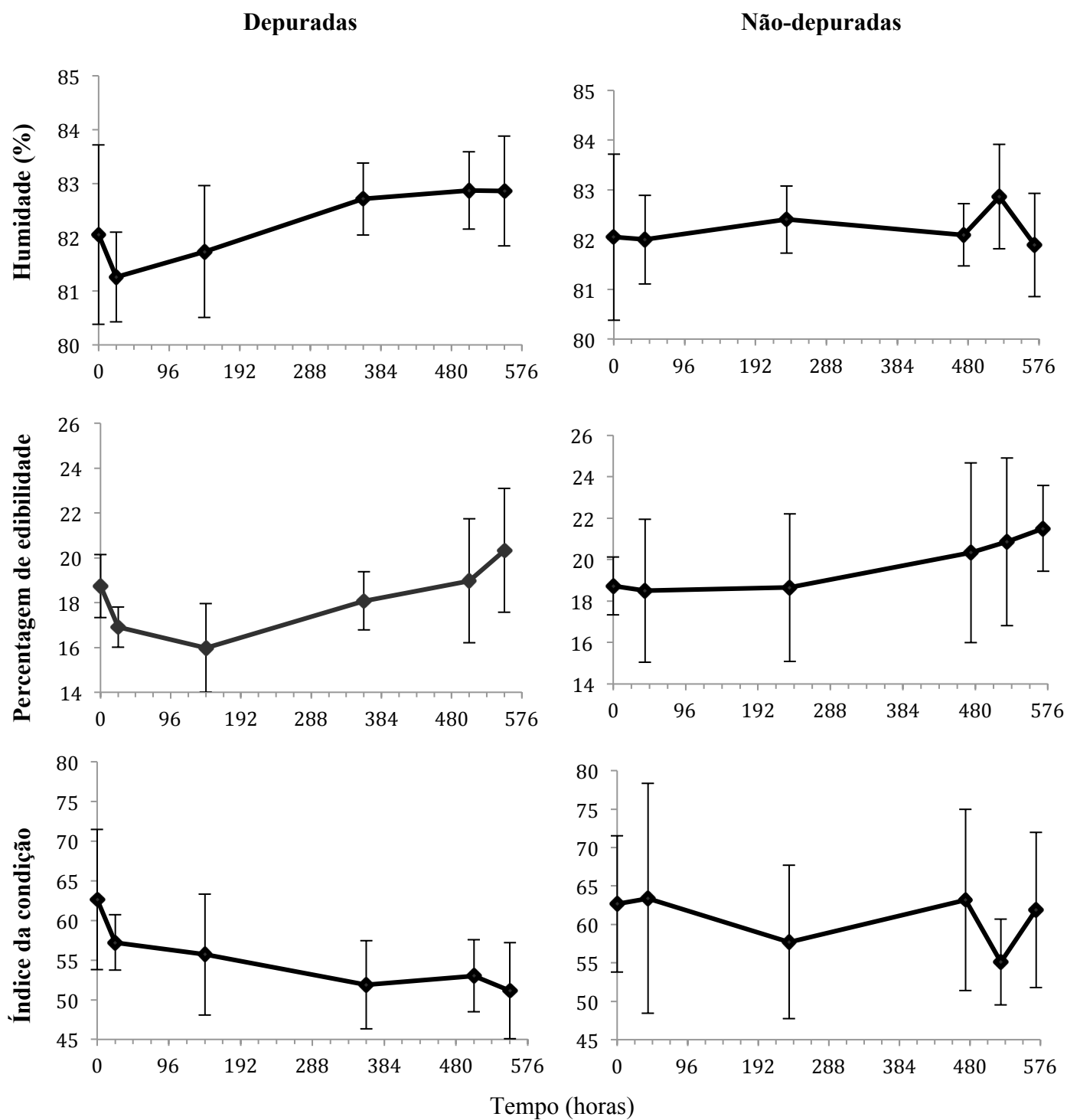
#### 3.4.1. Parâmetros de qualidade biológica/comercial

Nesta experiência, realizada com amêijoas-boas proveniente de viveiro-depuradas e não-depuradas e conservadas a 5°C, foram determinados vários parâmetros biométricos de forma a descrever os espécimes, designadamente percentagem de humidade, percentagem de edibilidade e índice da condição.

Na figura 16 apresentam-se os valores médios de cada parâmetro (e respectivos desvios-padrão), sendo possível comparar os dados dos ensaios entre amêijoas depuradas e não-depuradas. Quanto à percentagem de humidade é possível verificar em termos médios que ocorre alguma variação ao longo do tempo de conservação (574 horas/24 dias) tanto nas amêijoas depuradas como nas amêijoas que não sofreram depuração, com valores entre 81 e 82%. Todavia a variabilidade (desvio-padrão) das estimativas mascara os padrões observados.

Quanto à percentagem de edibilidade, inicialmente ocorreu um decréscimo nos valores, para posteriormente, e até ao fim do ensaio experimental, os valores aumentarem (Figura 16). Esta tendência foi mais acentuada nos resultados obtidos com amêijoa depurada, ocorrendo entre as zero e 144 h (6 d) uma diminuição de 18,7% até 16,0%, sendo que após as 144 h os valores aumentam gradualmente até ao fim do ensaio experimental (552 h/23 d), obtendo-se um valor de 20,3%. No caso das amêijoas não-depuradas, o decréscimo inicial na percentagem de edibilidade foi mínimo de 18,7% às 0 h para 18,5% às 42 h do ensaio experimental. Após esta diminuição, ocorreu um aumento de valores gradualmente até às 570 h, i.e. fim do ensaio experimental, 24 d) em que se obteve 21,5%. Os valores obtidos no fim do ensaio foram muito próximos, divergindo menos de 1,2%. É de salientar que os desvios-padrão foram relativamente elevados, demonstrando que houve alguma variabilidade dos valores em torno da média.

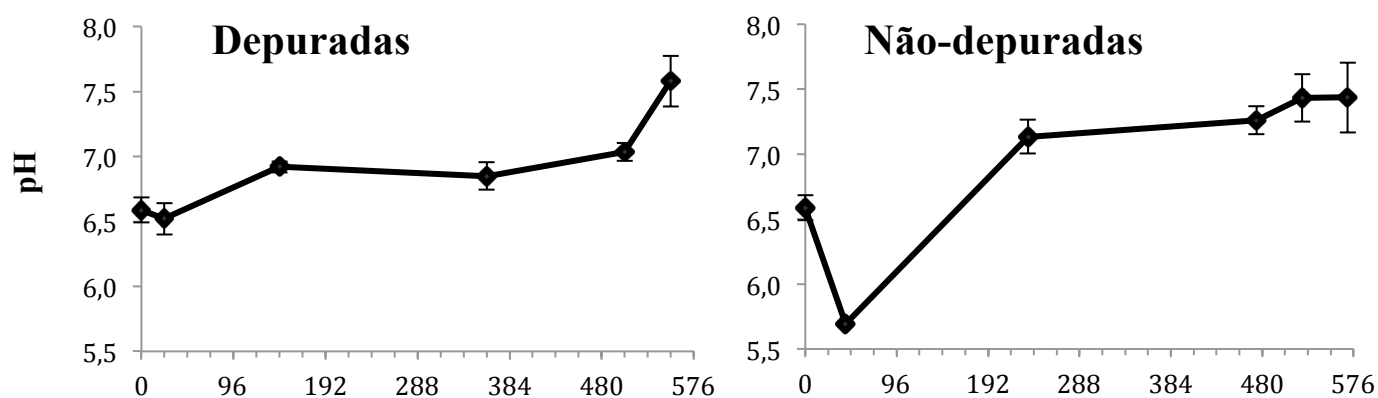
Por fim, na amostra de amêijoas depuradas o índice da condição diminuiu ao longo do tempo de ensaio experimental de 62,6 para 51,1. Comparativamente, nas amêijoas não sujeitas a depuração a diminuição foi menor, de 62,6 para 61,9 ao fim de 570 h (24 d), mas observou-se grande variabilidade nos dados evidenciada pelos desvios-padrão muito elevados. O intervalo no índice da condição nas amêijoas depuradas foi de 51,1 e 62,6, enquanto que no ensaio com amêijoas não-depuradas os valores variaram entre 55,1 e 63,4.



**Figura 16.** Variações médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de humidade, percentagem de edibilidade e índice da condição observados ao longo do ensaio experimental.

### 3.4.2. pH e teor em ABVT

Nas medições do pH (Figura17) observou-se um decréscimo nos valores, ligeiro nas amêijoas depuradas (de 6,59 a 6,52) mas mais acentuado (de 6,59 a 5,69) nas amêijoas não-depuradas. Após a diminuição inicial, os valores de pH aumentaram até ao fim do ensaio experimental. No caso das amêijoas não-depuradas, esse aumento foi particularmente evidente na fase final do ensaio, i.e. últimas 48 h do período de 552 h/23 d, até o pH atingir 7,58. Pelo contrário, no caso das amêijoas depuradas verificou-se um aumento do pH a partir das 42 horas até ao fim do ensaio, em que o valor obtido foi de 7,44, bastante próximo do observado nas amêijoas não-depuradas no final da experiência.

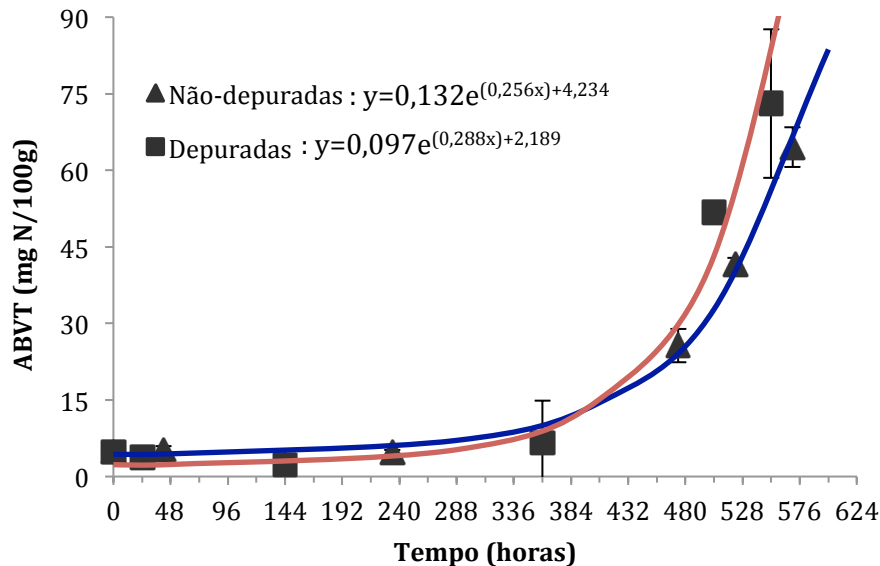


**Figura 17.** Variações médias e respetivos desvios-padrão do pH observados ao longo do ensaio experimental em amostras de amêijoas depuradas e não-depuradas.

Na figura 18 apresenta-se a variação de valores de ABVT obtidos para a amêijoa-boia conservada a 5 °C durante o período de experimental (cerca de 570 h/24 d no caso das amêijoas não-depuradas e 552 h/23 d para as amêijoas depuradas). Ilustram-se, ainda,, os modelos exponenciais com "offset",  $y = a^{(bx+c)}$ , que se ajustaram visivelmente aos dados obtidos e cujos coeficientes de determinação são  $R^2=0,999$  e  $R^2=0,967$  respetivamente.

As amêijoas apresentaram um resultado médio inicial (tempo zero) do teor em ABVT de cerca de 4,81 mg N/100g. Este resultado foi igual para o tempo zero das amêijoas depuradas, visto as amêijoas terem todas a mesma proveniência e o lote usado posteriormente de amêijoas depuradas ter estado as primeiras 24 horas a depurar. Tanto as amostras depuradas como as não-depuradas sofreram um

incremento exponencial do teor em ABVT durante o tempo em que a experiência se desenvolveu: no caso das amêijoas depuradas,  $73,07 \pm 3,86$  mg N/100g após 552 h (23 dias); e na amostra não-depurada  $64,51 \pm 14,56$  mg N/100g às 570 h (24 dias)..



**Figura 18.** Variação do ABVT em amêijoas depuradas e não-depuradas conservadas a 5 °C em função do tempo de conservação.

Os parâmetros do modelo exponencial “com offset” ajustado aos dados foram  $a=0,132 (\pm 0,038)$ ,  $b=0,256 (\pm 0,012)$  e  $c=4,234 (\pm 0,661)$  para a amostra de amêijoas não-depuradas e  $a=0,097 (\pm 0,182)$ ,  $b=0,288 (\pm 0,082)$  e  $c=2,185 (\pm 4,322)$  para a amostra de amêijoas depuradas.

### 3.4.3. Determinações microbiológicas

Os resultados obtidos das contagens de microrganismos cultiváveis a 30°C (i.e. contagens totais), de *Enterobacteriaceae* e de microrganismos psicrotróficos são apresentados na figura 19. Pode-se observar o *crescimento* de microrganismos ao longo do tempo (em horas), tanto para amêijoas sujeitas a depuração como no caso das amêijoas não-depuradas.

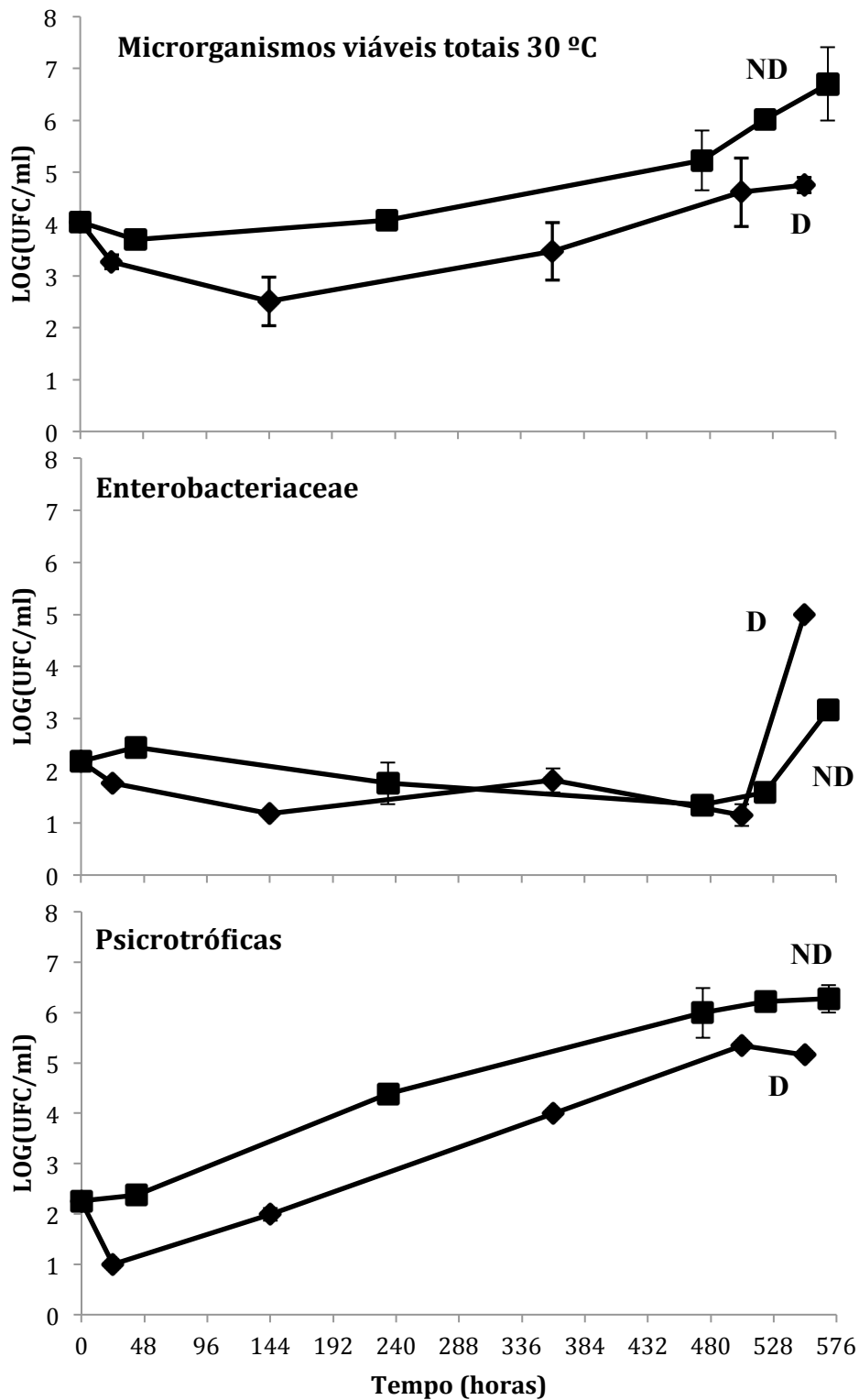
Relativamente à contagem de microrganismos viáveis totais a 30 °C (Figura 19) verificou-se que, independentemente da depuração, a tendência foi o número de microrganismos aumentar, embora no início ocorra uma diminuição. Após 144 horas, observou-se um aumento nas contagens de microrganismos cultiváveis a 30 °C, que

durou até ao fim do ensaio experimental, sendo expectável que continuasse a aumentar caso o ensaio fosse prolongado. Assim sendo, o valor observado no fim do ensaio experimental, ao fim de 552 h (23 dias) foi de 4,75 log(UFC/ml).

No caso das contagens de microrganismos viáveis totais realizadas em amêijoas não-depuradas verificou-se uma pequena diminuição nas primeiras 42 h, sendo que após este momento as contagens de microrganismos, aumentaram, tendo o estudo terminado ao fim de 570 h (cerca de 24 dias) com uma leitura de 6,70 log(UFC/ml).

As contagens de *Enterobacteriaceae* (Figura 19) mantiveram-se estáveis, entre 1,2 e 1,6 log(UFC/ml), durante as primeiras 500 h (cerca de 21 dias) do ensaio experimental. Depois aumentaram de 1,2 log(UFC/ml) para 5,0 log(UFC/ml) nas amêijoas depuradas e de 1,6 log(UFC/ml) para 3,2 log(UFC/ml) nas amêijoas não-depuradas.

Por fim, no caso das contagens de microrganismos psicotróficos (Figura 19) verificou-se uma tendência para a população destes microrganismos aumentarem muito claramente. Na amostra com amêijoas depuradas houve um decréscimo inicial de 2,3 log(UFC/ml) para 1 log(UFC/ml). Após esse decréscimo inicial verificou-se um aumento linear (em escala logarítmica) até às 504 h (21 dias), conseguindo-se determinar que em 480 h (20 dias) de ensaio experimental ocorreu um aumento de microrganismos psicotróficos de 1,3 log(UFC/ml) para 5,3 log(UFC/ml). Após este aumento, observou-se uma ligeira diminuição até ao fim do ensaio experimental, diminuindo de 5,3 log(UFC/ml) para 5,2 log(UFC/ml). Na amostra de amêijoas não-depuradas não se observou a diminuição na quantidade microrganismos psicotróficos nas primeiras 24 horas, como se verificou na amostra depurada, ocorrendo um aumento contínuo ao longo do ensaio sendo que a partir das 522 h (cerca de 22 dias) o aumento é ligeiro obtendo-se 6,3 log(UFC/ml) às 570 h (aproximadamente 24 dias).



**Figura 19.** Variação das populações de microrganismos a 30 °C (contagem de microrganismos viáveis totais), *Enterobacteriaceae* e psicotróficos em amêijoas-depurada e não-depurada conservada a 5 °C e respectivos desvios padrão.

### **3.5. Comparação do efeito da depuração sobre as características sensoriais da amêijoabo**

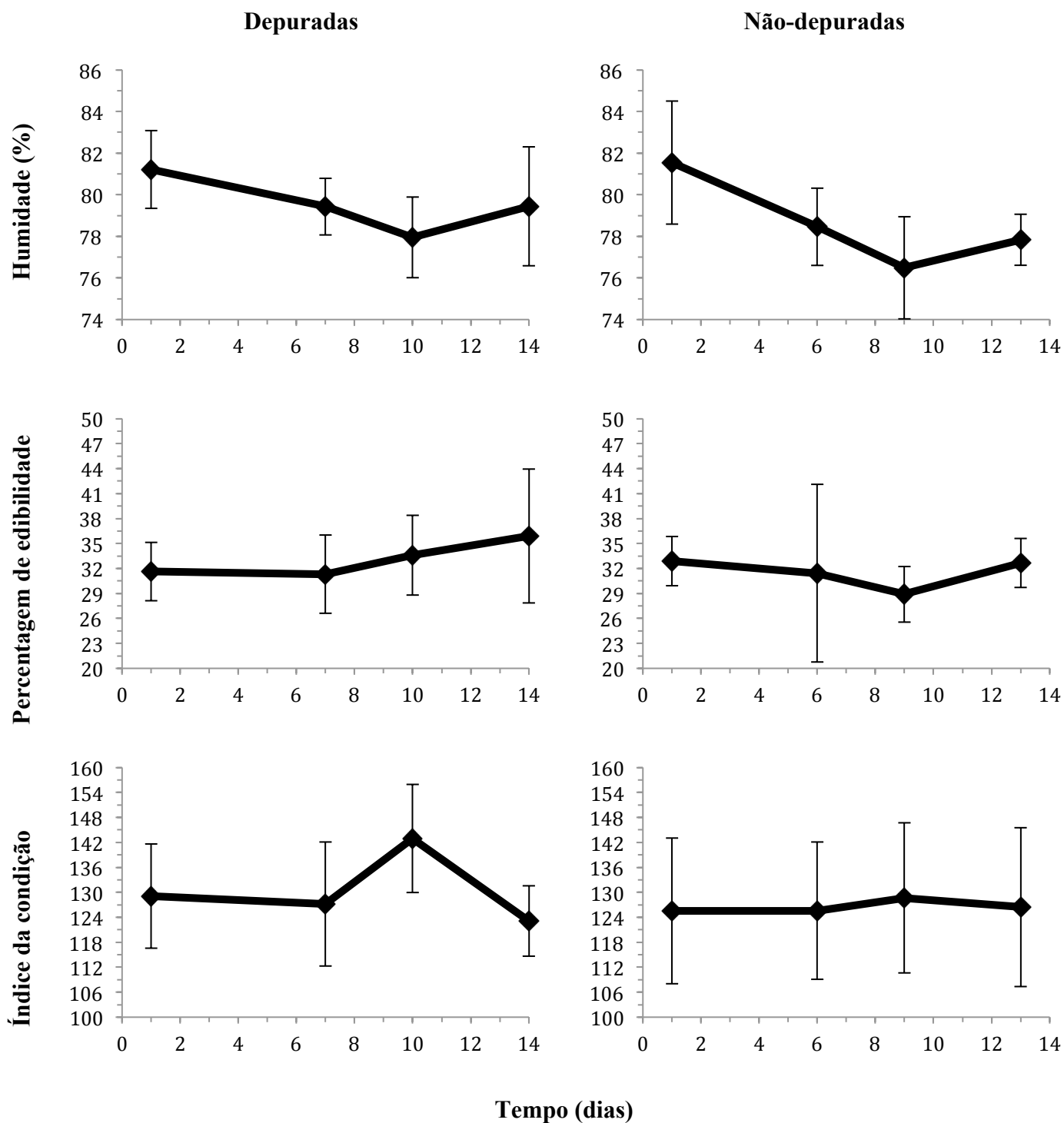
#### **3.5.1. Parâmetros de qualidade biológica/comercial**

A avaliação sensorial da amêijoabo foi efetuada em espécimes conservados durante 14 dias a 5 °C e tomou em consideração atributos relativos ao aspeto, e.g. cor e brilho do “miolo”, e odor. Na figura 20 apresentam-se os resultados dos parâmetros biométricos usados para caracterização as amêijoas envolvidas na avaliação sensorial, designadamente a percentagem de humidade, percentagem de edibilidade e índice da condição.

A percentagem de humidade (figura 20) variou de forma similar nas amostras de amêijoas depuradas e não-depuradas: após uma diminuição de 3-5% dos valores iniciais (ca. 81%) nos primeiros nove/dez dias verificou-se um ligeiro aumento na percentagem de humidade até ao fim do ensaio experimental, mais concretamente de 78,0% a 79,4% na amostra de amêijoas depuradas e de 76,5% a 77,8% nas não depuradas.

Quanto à percentagem de edibilidade (figura 20), a dinâmica durante o ensaio foi também muito semelhante nas amostras de amêijoas depuradas e não-depuradas. Aquele parâmetro manteve-se relativamente estável entre o 1º dia e o 7º dia na amostra depurada e diminuiu (de 32,9% para 28,9%) na amostra não-depurada. A partir do 7º dia, verificou-se um ligeiro aumento da percentagem de edibilidade até ao fim do ensaio experimental, embora não seja um aumento relevante.

O índice da condição médio foi ligeiramente diferente entre amostras, tendo a amostra depurada obtido resultados mais elevados e variações mais bruscas do que as que se verifica na amostra não depurada. Na amostra depurada obteve-se no primeiro dia um índice da condição de 129,1, tendo este sofrido uma ligeira diminuição até ao sétimo dia para 127,2, tendo aumentado para 142,9 até ao décimo dia, após o qual se verifica nova diminuição para o valor final obtido ao décimo quarto dia de 123,1. O valor obtido ao décimo dia é bastante elevado em comparação com os valores obtidos no restante ensaio. Quanto à amostra não depurada, a variação não foi tão expressiva, entre 125,5 e 128,7, embora os desvios padrão calculados mostrem grande variabilidade à volta dos valores da média.

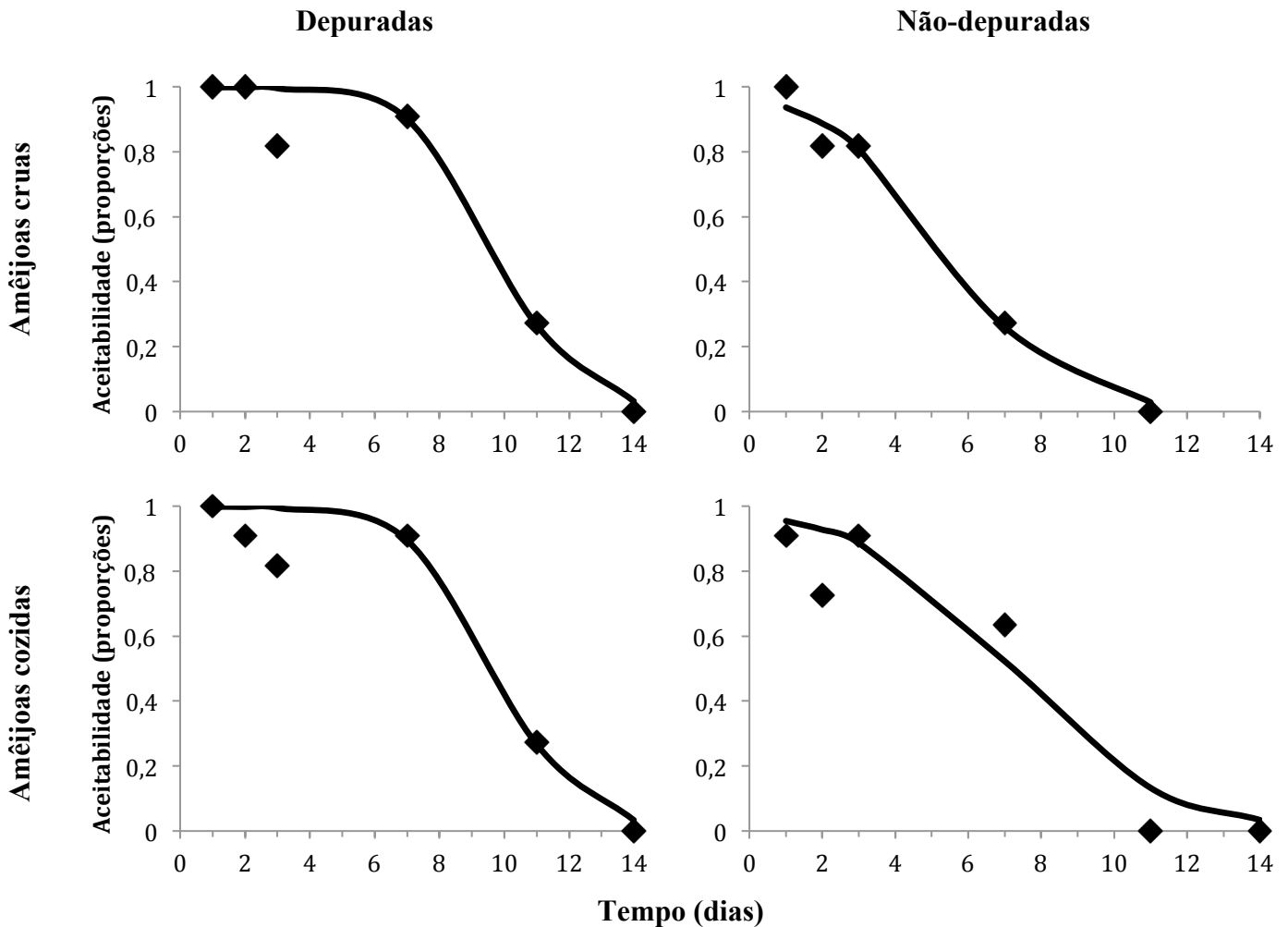


**Figura 20.** Variação (média e respetivos desvios padrão) observada ao longo do ensaio experimental na da percentagem de humidade, percentagem de edibilidade e índice da condição na amêijoia-boa *Ruditapes decussatus* depurada e não-depurada.

### 3.5.2. Aceitabilidade organolética

Na figura 21 apresentam-se, os resultados relativos à aceitabilidade para consumo da amêijoia-boa pelo painel de provadores obtidos com as amêijoas cruas depuradas e

não-depuradas e o mesmo para as amêijoas cozidas. Incluem-se, também, os modelos logísticos ajustados aos dados.



**Figura 21.** Aceitabilidade em proporções do painel de provadores em relação ao consumo de amêijoas depuradas e não depuradas, cruas e cozidas ao longo do tempo em dias.

No caso das amêijoas depuradas, tanto as que foram analisadas cruas como aquelas que foram avaliadas cozidas, o ensaio experimental durou 14 dias. Nesse dia, todo o painel de provadores rejeitou as amêijoas. Pelo contrário, as amêijoas não-depuradas foram rejeitadas pelo painel de provadores ao 11º dia de experiência.

As amêijoas cruas depuradas dadas a provar ao painel de provadores, sofreram maior rejeição entre o 7º dia e o 11º, tendo-se obtido um  $t_{50}=9,74$  dias ( $\pm 0,55$ , erro-padrão ou SE). Quanto às amêijoas cruas não-depuradas, registou-se a rejeição entre o 3º dia e o 7º dia, tendo o  $t_{50}$  sido cerca de metade da amostra referida anteriormente,  $t_{50}=5,32$  dias ( $\pm 0,29$  SE). Ao contrário do que se verificou para a amostra de amêijoas

cruas depuradas ( $r^2 = 0,965$ ), o modelo logístico ajustou-se bastante melhor aos dados das amêijoas cruas não-depuradas ( $r^2 = 0,990$ ).

As amêijoas cozidas depuradas e não-depuradas apresentaram resultados mais homogêneos entre si do que as amêijoas cruas, tendo as estimativas de  $t_{50}$  sido muito próximas, com  $t_{50}=9,72$  dias ( $\pm 0,61$ ) para as amêijoas depuradas e  $t_{50}=7,19$  dias ( $\pm 0,91$ ) para as amêijoas não-depuradas. Todavia, verificou-se que a partir do 7º dia de ensaio experimental a rejeição foi muito elevada, sendo que ao 11º dia nenhum dos provadores aceitaria consumir as amêijoas não-depuradas; isto só aconteceu ao 14º dia para as amêijoas depuradas.

### 3.5.3. Descritores organoléticos no momento de rejeição

**Quadro 3.** Valores médios ( $\pm$  desvio-padrão) atribuídos a cada um dos descritores quando 50% dos provadores rejeitaram a amostra.

Parâmetros		Amêijoa crua		Amêijoa cozida	
		Depuradas $t_{50}=10$ dias	Não-depuradas $t_{50}=5$ dias	Depuradas $t_{50}=10$ dias	Não-depuradas $t_{50}=7$ dias
Odor/ Cheiro	Fresco	1,2 $\pm$ 1,5	1,2 - 1,9	1,6 $\pm$ 1,1	0,5 - 2,1
	Amoniacal	1,5 $\pm$ 1,5	0,4 - 1,4	1,0 $\pm$ 1,0	0,3 - 2,6
	Sulfídrico	1,5 $\pm$ 2,0	0 - 1,2	0,5 $\pm$ 0,7	0,2 - 2,9
Aspeto/ Cor	Brilho da superfície	2,9 $\pm$ 1,3	2,8 - 3,3	0,9 $\pm$ 0,9	0,2 - 0,9
	Cor marfim nacarada	2,8 $\pm$ 1,4	2,6 - 2,7	2,3 $\pm$ 1,3	1,5 - 1,8
	cor branca leitosa	2,3 $\pm$ 1,2	2,2 - 2,3	1,5 $\pm$ 1,4	1,5 - 2,3
	Cor amarelada/acastanhada	1,8 $\pm$ 1,3	0,9 - 1,5	2,3 $\pm$ 0,6	1,9 - 2,8

A avaliação sensorial da amêijoa-boia permitiu descrever os atributos sensoriais dos espécimes durante o período experimental. No quadro 4 apresentam-se as avaliações

médias para cada descritor no momento em que 50% dos provadores rejeitaram consumir a amostra, i.e.  $t_{50}$ .

De facto, os resultados do quadro 4 apresentam-se de duas formas distintas, para a amostra depurada apresentam-se a média e respetivo desvio-padrão enquanto para a amostra não-depurada se apresentam os resultados pelos intervalos dos valores médios para a duas sessões de prova imediatamente anterior e posterior a  $t_{50}$ . Os resultados estão apresentados desta forma pois as amostras não-depuradas sofreram uma rejeição abrupta entre 2 momentos de amostragem, e. g. diminuição de 82% para 27% entre os dias 3 e 7 na amostra não-depurada crua e a diminuição de cerca de 60% para 0% de aceitabilidade entre os dias 7 e 11, na amostra cozida não-depurada.

Se se considerarem os desvios-padrão ou os intervalos de classificação, os valores apresentados no quadro 4 são semelhantes entre amostras depuradas e não depuradas, cruas ou cozidas, para cada parâmetro.

## **4. Discussão**

### **4.1. Estudo da mortalidade de amêijoas depuradas e não-depuradas conservadas em refrigeração**

No estudo da mortalidade “natural” de amêijoas (de Inverno) não-depuradas e conservadas a 5°C obteve-se um  $t_{50}$  de cerca 19 dias, tendo sido terminado o ensaio ao 29º dia. Em comparação com resultados obtidos no ensaio com amêijoas colhidas no início do Verão e também não-depuradas, é possível verificar que estas últimas sobreviveram menos tempo em relação às amêijoas de inverno, apresentando um  $t_{50}$  de 12 dias, e tendo-se terminado o ensaio ao 16º dia, cerca de 13 dias antes da amostra com amêijoas capturadas no Inverno.

Aníbal et al. (2011) e Ojea et al. (2004) apontaram a sazonalidade do ciclo de vida reprodutivo das amêijoas como responsável pelas alterações observadas ao nível do peso e composição bioquímica e, em consequência, no índice da condição e da percentagem de edibilidade. Nos meses de Inverno (Novembro e Dezembro) ocorre a fase de repouso e na Primavera e Verão ocorrem as fases da gametogénese, maturação e finalmente desova (Ojea et al., 2004). Mais, segundo Ojea et al. (2004) a variação que ocorre na composição bioquímica está grandemente relacionada com a mudança em conteúdo de glicogénio, enquanto os conteúdos proteicos ( $48,1\% \pm 1,8$ ) e lipídicos ( $5,6\% \pm 0,6$ ) se mantêm relativamente constantes ao longo do ano. O desenvolvimento das gónadas influencia o peso, verificando-se diminuição nessa fase do peso dos espécimes, o índice da condição e a percentagem de edibilidade.

Quando se comparam resultados em termos de  $t_{50}$  para amostras de amêijoas depuradas e não-depuradas (colhidas no Verão), verificou-se que foram semelhantes. A diferença de cerca de três dias no  $t_{50}$  entre amêijoas depuradas e não-depuradas (14,0 vs. 11,3, respetivamente) pode refletir o efeito positivo que o processo da depuração tem, reduzindo substancialmente o número de microrganismos presentes na amêijoa (Oliveira et al., 2011) e, dessa forma, estendendo o tempo de conservação útil.

## 4.2. Efeito da temperatura na deterioração post-mortem de amêijoas-boas não depuradas

Os parâmetros selecionados para aferir da qualidade biológica/comercial das amêijoas, percentagem de humidade, índice da condição e percentagem de edibilidade em amêijoas (Inverno) *post-mortem* conservadas a diferentes temperaturas (5, 15 e 25°C) variaram ao longo do tempo de forma diferente em função das temperaturas.

Inicialmente a percentagem de humidade apresentou valores muito similares para qualquer das temperaturas testadas. Mas, ao contrário das amêijoas conservadas a 15 e 25 °C cuja percentagem de humidade se manteve relativamente constante (ca. de 85%), a 5 °C a humidade reduziu-se drasticamente, tendo passado de aproximadamente 85% para 70%. Esta diminuição na humidade ocorreu devido à circulação intensa de ar frio e seco produzido pela câmara de refrigeração utilizada. Uma vez que no interior da câmara as amêijoas abriam as valvas, o ar circulante, frio e seco, a que ficaram expostas terá removido parte da água que continham no seu interior, acabando por secar o miolo. Este fenómeno está relacionado com a termodinâmica da refrigeração: se a temperatura for muito baixa e os alimentos muito húmidos, parte da humidade será removida do produto alimentar pelo o ar frio que circula no refrigerador (Brackmann et al., 2004). Nas amostras mantidas a 15 °C e 25 °C, as perdas de humidades ao longo do ensaio experimental foram bastante reduzidas (a amostra conservada a 25° C foi aquela que menos variou). Nestes dois casos, a água retida pelo encerramento da concha e a humidade que o miolo da amêijoa possuía inicialmente não foram removidas pelo ar circulante.

À exceção de um valor (demasiado) elevado após 24 h de conservação a 15 °C (IC=139), o índice de condição das amêijoas neste ensaio variou pouco,  $60 < IC < 67$ . Segundo Aníbal et al. (2011) os valores de índice da condição na época fria (Inverno) são mais baixos que os verificados na época quente, tendo apresentando valores entre 80 e 90 para os meses entre Outubro e Dezembro. Neste trabalho experimental obtiveram-se valores compreendidos entre 60 e 80. É de salientar que as amostras foram conservadas a temperaturas diferentes, o que pode explicar os valores ligeiramente inferiores aos obtidos por Aníbal et al (2011). O facto de, no Inverno, se terem verificado índices da condição nas amêijoas inferiores está relacionado com o seu ciclo reprodutivo, o que influencia grandemente a componente bioquímica desses seres. A gametogénese ocorre na Primavera e início de Verão, onde se verificam valores mais elevados do índice da condição, enquanto nos meses de Novembro e

Dezembro ocorre um período de repouso no ciclo de reprodutivo e durante o qual os valores obtidos para a condição são inferiores (Ojea et al., 2004). A ocorrência invulgar de IC=139, pode ser explicada por um possível erro do operador, como por exemplo o ganho de humidade após o processo de secagem da amostra, desta forma provocaria os aumentos de peso tanto da concha como da parte edível (*vulgo* miolo).

Relativamente à percentagem de edibilidade (PE), os valores médios obtidos neste trabalho (21-30%) são semelhantes, embora ligeiramente inferiores, aos obtidos por Aníbal et al. (2011), nos meses de Novembro e Dezembro, reportaram valores entre 29 e 30%. A variabilidade inter-individual e o procedimento de obtenção deste índice mascararam um eventual padrão na dinâmica da PE média.

Quanto ao pH, em todas as temperaturas testadas se observou uma tendência inicial para ocorrer uma descida dos valores iniciais obtidos (pH=6,7). A diminuição do valor do pH ocorreu no momento em que se começou a sentir perda de frescura nas amostras, tendo como evidências os valores de ABVT que começam a aumentar e atingir valores relativamente elevados. Nas amostras conservadas a 25°C, verificou-se um claro aumento no pH nas últimas horas de ensaio, o que poderá significar que a amostra estava em deterioração (avançada) incorporando, em concentrações elevadas, os metabolitos da degradação das proteínas. De acordo com Howgate, (2009) é normal ocorrer um decréscimo do pH no pescado durante o *rigor mortis* (nos primeiros momentos *post-mortem*) devido à formação anaeróbica de ácido láctico a partir da conversão do glicogénio, podendo em fases mais avançadas ocorrer um aumento do pH devido à presença e formação de compostos azotados. Compostos como a amónia estão presentes em todas as espécies de pescado pouco depois da morte, devido à desaminação da adenosina monofosfato em inosina monofosfato. Este último composto tem tendência a aumentar a sua concentração em fases posteriores da deterioração através da ação de bactérias proteolíticas. O teor em compostos básicos aumenta também devido à transformação do óxido de trimetilamina em trimetilamina pela microbiota bacteriana associada à deterioração e à separação enzimática que ocorre ao óxido de trimetilamina em dimetilamina e formaldeído (Howgate, 2009). Quanto maior for a quantidade inicial de glicogénio presente na espécie de pescado maior será a diminuição de pH verificada durante o *rigor mortis*, sendo possível observar esta diferença em atuns por ex., em que se verificaram diminuições dos seus pH para valores inferiores a 6, enquanto na maioria das outras espécies o pH diminui para valores entre 6 e 6,8 (Howgate, 2009). De outra

perspetiva, Huss, (1988) afirma que que o glicogénio como é maioritariamente "quebrado" hidroliticamente em glucose após a morte, não há uma correlação direta entre o conteúdo de glicogénio e o pH *post-mortem*. Outra afirmação, diz ter sido mostrado empiricamente que fatores como deixar os animais sem alimento por determinados períodos de tempo antes da morte do pescado influencia os valores pH. Embora as alterações no pH por norma não sejam muito grandes, são muito importantes pois o pH *post-mortem* é de acordo com Huss, (1988) o fator mais importante influenciando a textura da carne do pescado.

O teor de ABVT em amêijoa-boia *post-mortem* conservada a 5, 15 e 25°C, aumentou exponencialmente. No fim do ensaio experimental e nos três casos, as amostras encontravam-se em mau estado para o consumo humano, designadamente em termos de aromas desagradáveis (*off-odours*). Mais, verificou-se claramente que quanto mais elevada a temperatura mais rapidamente os teores de ABVT atingiram valores demasiado elevados em comparação com os indicados no Regulamento (CE) 2074/2005 para pescado (35 mg de azoto/100 g de tecido muscular). Este limite foi ultrapassado após 192 h (i.e. 8 dias) pela amostra conservada a 5 °C, depois de 54 h (>2 dias) pela amostra mantida a 15 °C e ao fim de apenas 31 h (1,3 dias) pela amostra a 25 °C: As taxas de incremento de ABVT estimadas para os modelos exponenciais refletem esse efeito da temperatura: variaram entre 0,017 h<sup>-1</sup> a 5 °C, 0,041 h<sup>-1</sup> a 15 °C e 0,103 h<sup>-1</sup> a 25 °C. Complementarmente, o coeficiente térmico Q<sub>10</sub> obtido, aponta para um aumento de 3,44 vezes entre os 5°C e os 15°C de incremento de ABVT e um aumento de 2,49 entre os 15°C e os 25°C.

Os valores do coeficiente térmico Q<sub>10</sub> obtidos confirmam a dependência do teor em ABVT em relação à temperatura. Em termos práticos, os resultados demonstram um maior incremento no teor de ABVT entre as temperaturas de 5 a 15°C, do que entre 15 e 25°C. Isto poderá ocorrer porque o intervalo de temperaturas 5-15°C é mais relevante para o aumento dos valores de ABVT do que 15-25 °C (Gillooly et al., 2001). Deste modo é possível perceber que temperaturas de 5 °C ou inferiores para o armazenamento de amêijoas em estado *post-mortem* são importantes para um tempo de prateleira superior, dado que quanto maior for a temperatura mais rapidamente dar-se-á a deterioração do organismo.

### 4.3. Comparação do efeito da depuração sobre parâmetros indicadores de qualidade e deterioração

Em termos de qualidade biológica/comercial, os espécimes usados no ensaio experimental realizado para estudar o efeito da depuração sobre a qualidade físico-bioquímica (pH e teor em ABVT) e microbiológica de amêijoas de viveiro, apresentavam valores semelhantes da percentagem de humidade entre espécimes depurados e a não-depurados, entre 81 e 83% ao longo das 552 e 570 horas de ensaio experimental, respetivamente. Resultados obtidos por Aníbal *et al* (2011), mostraram uma variação na percentagem de humidade entre 83 e 86% no primeiro trimestre do ano, valores muito próximos aos apresentados no presente trabalho. A ligeira diferença pode-se dever ao facto de as amostras analisadas neste trabalho terem sido conservadas a 5 °C ao longo do tempo enquanto os espécimes usados na experiência de Aníbal *et al.* (2011) foram analisadas após o transporte do viveiro e um curto período de estabilização em água do mar pré-filtrada durante 3 a 4 horas no laboratório, não havendo a influência das baixas temperaturas (5 °C) a que as amostras no presente trabalho estiveram sujeitas. Em termos de fração edível, as amêijoas na amostra depurada apresentaram uma perda de edibilidade após a depuração, enquanto na amostra de amêijoas não-depurada, os valores mantiveram-se estáveis até às 234 horas de ensaio experimental, momento a partir do qual ocorreu um ligeiro aumento até cerca de 21,5%. Este aumento embora não seja relevante poderá ter sido obtido devido uma deficiente secagem do excesso de água nas amostras. Relativamente ao índice de condição, a aparente diferença na dinâmica (em média) entre a amostra depurada e não-depurada é muito atenuada pela variabilidade entre espécimes (refletida nos desvios-padrão bastante grandes). Em termos globais, os valores obtidos no presente trabalho não são muito diferentes dos valores de índice da condição obtidos por Aníbal *et al* (2011) em *Ruditapes decussatus* ou Orban *et al.* (2006) em *Chamelea gallina*, que apresentou valores no primeiro trimestre do ano entre 70 e 80, sendo que as amostras utilizadas não foram sujeitas a depuração nem a conservação a 5°C.

Em todos os parâmetros biométricos determinados nas amostras depuradas ocorreu uma diminuição nos parâmetros nas primeiras 24 horas, o que de certa forma pode ser apontado como resultado do processo de depuração. A depuração das amêijoas faz com que estas fiquem privadas de alimento, por isso estando em jejum ao longo de

todo o processo, e recebam constantemente água renovada, aumentando o stress nos organismos (Oliveira et al., 2011).

Nesta experiência, a diminuição inicial (nas primeiras 24 h) do pH observada foi muito menor na amostra depurada por comparação com a amostra não-depurada. Esta diferença pode estar relacionada com o facto da amostra não-depurada ter iniciado processos autolíticos mais acentuados em relação a amostra que sofreu depuração, sendo que este decréscimo também pode ser resultado dos elevados níveis de glicogénio nas amêijoas e do facto da deterioração nos moluscos ser parcialmente fermentativa (Cao et al., 2009). Após esta diminuição, ambas as amostras sofreram um aumento de pH, bem mais acentuado na amostra não-depurada do que na amostra depurada. Huss (1988) e Ruiz-Capillas and Moral, (2005) referem que é possível, no período *post-mortem*, que ocorra um aumento do pH devido à formação de compostos básicos, embora seja possível que se mantenha relativamente estável ao longo do processo de deterioração.

O teor em ABVT determinado em amêijoas depuradas e não-depuradas ao longo do tempo de conservação a 5 °C aumentou de forma exponencial, particularmente acentuada a partir das 300 horas de ensaio experimental. Huss (1988) refere que uma das desvantagens da análise do teor em ABVT é o facto de os valores serem muito baixos enquanto o produto está em condições para ser consumido e só muito perto do ponto da rejeição do produto é que os valores de ABVT muito rapidamente sobem para níveis elevados (neste ensaio após ca. de 400 h de conservação). De facto, enquanto os espécimes estão vivos, se alimentam e são capazes de resistir às *agressões* do meio, os processos responsáveis pela produção de compostos azotados (incl. ABVT) não ocorrem, mas assim que indivíduos perecem cada vez mais, perdem a frescura e deterioram-se cada vez mais rapidamente (Castro et al., 2006). Os modelos exponenciais com *offset* ( $y = a^{bx+c}$ ) ajustados aos dados descreveram de forma muito significativa este fenómeno e confirmaram a similaridade entre as dinâmicas do teor em ABVT em amêijoas depuradas e não-depuradas designadamente nas taxas de incremento ( $0,256 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$  e  $0,288 \pm 0,082 \text{ h}^{-1}$ , respetivamente). O ensaio foi dado como terminado ao fim de mais de 550 h (>23 dias) quando se atingiram valores de 73,1 mg N/100g para a amostra de amêijoas depuradas e 64,5 mg N/100g para a amostra não-depurada, respetivamente.

Os valores de ABVT que servem de referência/limite de aceitação para o consumo, têm sido assunto de debate entre vários autores, que apontam valores distintos para

diferentes espécies. Todavia, o Regulamento (CE) nº 2074/2005 da Comissão Europeia e o Regulamento (CE) nº 1022/2008 da Comissão Europeia estipulam valores-limite do teor em ABVT para três grupos de espécies de *pescado*: 1) *Sebastes* spp., *Helicolenus dactylopterus*, *Sebastichthys capensis*; 2) Espécies que pertencem à família *Pleuronectidae* (à exceção do alabote: *Hippoglossus* spp.); e 3) *Salmo salar*, espécies que pertencem à família *Merluccidae*, espécies que pertencem à família *Gadidae*, respetivamente 25, 30 e 35 mg /100g. Não são, no entanto, definidos quaisquer outros limites legais para outras espécies que não as mencionadas, embora esteja regulamentado nesse documento que devido à variação entre as espécies, pode igualmente afigurar-se adequado estabelecer limites de ABVT superiores para determinadas espécies, desde que o pescado (peixe, moluscos e crustáceos) continuasse a cumprir os critérios de frescura. Segundo Baixas-Nogueras *et al.* (2002) e Goulas *et al.*, (2005) o teor de ABVT, para o pescado, a partir do qual se consideram as amostras impróprias para consumo é de 35 mg N/100g. Complementarmente Goulas *et al.*, (2005) propõem, no caso dos mexilhões, que o limite seja definido entre 22 e 25 mg N/100g.

Neste trabalho, a avaliação da qualidade microbiológica de amêijoas-boas de viveiro capturadas no Inverno e conservadas a 5°C em câmara de refrigeração, baseou-se em grupos microbianos indicadores relativamente abrangentes tais como os mesófilos (cultiváveis) totais, as *Enterobacteriaceae* e os psicrotróficos. As contagens de microrganismos mesófilos e de psicrotróficos mostraram, como era expectável, uma dinâmica exponencial a partir das 48 horas de ensaio. Mais, depois da primeira contagem – realizada em amêijoas logo após chegada ao laboratório e antes de serem depuradas ou colocadas na câmara de refrigeração a 5 °C – as amostras depuradas revelaram um decréscimo de 1-2 log(UFC/ml), fruto certamente do processo de depuração pois no caso das amêijoas não-depuradas não se observou esse decréscimo inicial.

Por outro lado, os valores obtidos nas contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae* mantiveram-se praticamente constantes até cerca das 500 horas (~21 dias) de ensaio experimental, momento a partir do qual se verificou um crescimento enorme (de mais de 3 log(UFC/ml) no caso das amêijoas depuradas). A baixas temperaturas (por ex. 5 °C), o surgimento de *Enterobacteriaceae* é lento, assim como a sua atividade (Cao *et al.*, 2009). A presença dessa família de bactérias nas amostras pode ser preocupante pois inclui alguns microrganismos patogénicos, e.g.

*Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. Por outro lado, a ocorrência de *Enterobacteriaceae* na microbiota de espécies marinhas e o seu potencial de deterioração devem ser tomados em conta, especialmente em casos de ambientes aquáticos poluídos, dado que as amêijoas são organismos filtradores (Goulas and Kontominas, 2007). De facto, a presença de microrganismos entéricos humanos em produtos alimentares marinhos é uma clara evidência de contaminação de fonte terrestre (ICMSF, 1986).

A maioria dos animais aquáticos à exceção de alguns camarões tropicais, moluscos e peixes de água doce apresentam, no momento da captura, valores de microrganismos entre  $10^2$  e  $10^5$  por grama. Um aumento do número de colónias nas placas contadas para valores acima de  $10^6$  por grama indica um produto em estado não aconselhável para consumo humano e poderá ser associada e indicadora de um armazenamento longo a temperaturas baixas ou então a abusos de temperatura antes da congelação do produto (ICMSF, 1986). O valor de referência definido como limite superior para a presença de microrganismos segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986), entidade de referência, é de  $5 \cdot 10^5$  UFC/g, ou seja 5,7 log(UFC/g). Em termos de legislação nacional, o Decreto-Lei n.º 293/98 de 18 de Setembro e o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios não referem valores para microrganismos cultiváveis totais, *Enterobacteriaceae* ou psicrotóxicos, apresentando somente valores limites para a presença de *E. coli* (incl. nas *Enterobacteriaceae*), 230 NMP/100 g de carne e líquido intravalvar. Estes limites, em NMP em vez de UFC, não permitem comparar diretamente os valores tabelados com os obtidos neste trabalho realizado com a metodologia de contagem de colónias nas placas.

Os valores obtidos neste trabalho para as contagens de microrganismos cultiváveis totais apresentaram valores que excedem o limite apresentado pelo ICMSF (1986) (5,7 Log UFC/g) no caso da amostra não-depurada, embora só ocorra após 500 horas de ensaio – muito depois do  $t_{50}$  ou período habitual de consumo – enquanto na amostra depurada não foi atingido este limite. Relativamente às contagens de *Enterobacteriaceae*, estas foram semelhantes entre amostras depuradas e não-depuradas, mantendo-se relativamente baixas ao longo de todo o ensaio, só se verificando aumento elevados após 500 horas de ensaio. Estes valores foram semelhantes aos obtidos por Torres (2011) que em 7 dias de ensaio não ultrapassou os

2,5 log UFC/g para amostras conservadas a 4-9 °C. A deterioração das amêijoas conservadas em refrigeração não pode ser atribuída a estas bactérias, visto o desenvolvimento ser realmente baixo só apresentando valores elevados muito tempo depois das amêijoas não estarem em condições para ser consumidas. Os microrganismos psicrotróficos, em log(UFC/ml), apresentaram um crescimento relativamente linear ao longo do ensaio atingindo valores superiores aos apontados pelo ICMSF para a presença de microrganismos nos moluscos bivalves (i.e. 5,7 log UFC/g) no caso das amêijoas não-depuradas e após quase 500 horas de ensaio.

Os moluscos bivalves, são animais sésseis ou com reduzida mobilidade que se alimentam por filtração de pequenas partículas em suspensão – fitoplâncton, zooplâncton, vírus, bactérias e matéria inorgânica – pelo que (bio)acumulam *contaminates* que ocorrem naturalmente no meio ou são de origem antropogénica, incluindo microrganismos patogénicos e/ou biotoxinas produzidas por planctontes (Oliveira et al., 2011). A sua microbiota depende, por isso, muito da qualidade da água do meio, da água de depuração/lavagem, etc. (Nychas and Drosinos, 2010; Oliveira et al., 2011). Mais, a capacidade dos microrganismos “acumulados” persistirem e multiplicarem-se nos tecidos dos bivalves, apesar da proteção natural dos bivalves exercida pela atividade bactericida (dos componentes) da hemolinfa (Canesi et al., 2002; Pruzzo et al., 2005), também influencia a ocorrência de bivalves insalubres (Oliveira et al., 2011). Durante a primeira parte do ensaio os organismos estavam vivos e, embora com o tempo de ensaio a decorrer perdessem alguma qualidade biológica/comercial mas sobretudo do ponto de vista sensorial (v. seguir), não ocorreu nenhum crescimento anormal de microrganismos. Após a morte (da maioria) das amêijoas o crescimento de microrganismos torna-se de certa forma exponencial. De qualquer forma, há que salientar que os limites apontados pela legislação ou identidades oficiais só são ultrapassados já muito tempo depois do  $t_{50}$  (v. antes) ou dos consumidores rejeitarem os espécimes para consumo (v. seguir).

#### **4.4. Comparação do efeito da depuração sobre as características sensoriais e aceitabilidade de amêijoa-boia**

Na parte deste trabalho estudou-se a aceitabilidade organoléptica de amêijoa-boia depurada e não-depurada, crua e cozida. A ficha de prova sensorial apresentada incluía três descritores/parâmetros relacionados com o olfato (fresco, amoniacal e

sulfídrico) e quatro relacionados com o aspeto/cor (brilho da superfície do miolo, cor marfim-nacarada, cor branca ou leitosa e cor amarelada/acastanhada) do miolo.

Os resultados apontam para uma rejeição mais rápida da amostra não-depurada no caso de amêijoas cruas. O tempo para que 50% dos provadores rejeitassem a amostra não-depurada crua para consumo foi de 5,3 dias, bastante inferior aos 9,7 dias estimados para as amêijoas depuradas. No caso das amêijoas cozidas,  $t_{50}=7,2$  d para amostra não-depurada cozida enquanto para a amostra depurada cozida foi de 9,7 dias, ou seja praticamente 3 dias. No momento em que 50% dos provadores rejeitaram amostras, os descritores organoléticos apresentam informação importante que, de certa forma, justifica a rejeição por parte dos provadores. Na realidade, apesar da diferença entre  $t_{50}$  para amostras depuradas vs. não-depuradas, as características sensoriais foram classificadas de forma similar quer em termos de odor/cheiro (diminuição de 5 para 1,5 pontos, em média) como de aspeto/cor (de 5 para 2-3 pontos, em média).

## **5. Considerações finais e perspectivas futuras**

Com base no presente estudo pode concluir-se que, no que diz respeito à mortalidade *natural* de amêijoas-boas, estas acabam por sobreviver por mais tempo nos meses frios (Novembro e Dezembro),  $t_{50}$  de 19 dias, do que nos meses de Junho e Julho (início do Verão) em que  $t_{50}$  variou entre 11 e 14 d.

A temperatura de conservação (no intervalo 5-25 °C) confirma-se como fator muito significativo para a dinâmica do teor em ABVT em amêijoas *post-mortem*; quanto mais elevada a temperatura de conservação mais rapidamente as amêijoas se deterioram, atingindo - mais rapidamente - valores bastante elevados de ABVT. O ensaio em que amêijoas foram conservadas a 5 °C durou 192 horas terminando com um valor de 51,5 mg N/100g de ABVT, enquanto o ensaio de conservação a 15 °C durou 54 horas com 40,5 mg N/100g e aos 25 °C foram somente necessárias 31 horas para se atingir um valor de 79,3 mg N/100g. Foi, ainda, possível estimar as taxas (exponenciais) de incremento do teor em ABVT para aquelas temperaturas: 0,012 h<sup>-1</sup> aos 5 °C, 0,041 h<sup>-1</sup> aos 15 °C e 0,103 h<sup>-1</sup> aos 25 °C.

Em relação ao estudo do efeito da depuração sobre a dinâmica de parâmetros de qualidade biológica/comercial, pH, teor em ABVT e alguns grupos da microbiota das amêijoas, constatou-se neste trabalho que existe uma relação estreita entre a dinâmica dos grupos de microrganismos estudados, do pH e teor em ABVT e dos parâmetros usados para aferir da qualidade biológica/comercial das amêijoas. Mais, os valores obtidos para esses parâmetros não atingem nem ultrapassam limites propostos internacionalmente durante o tempo de conservação útil vulgarmente aceite no setor (incl. produtores, centros de depuração/expedição e distribuidores) que é de 8 dias. Ainda assim, e com base nos vários resultados obtidos, sugere-se que o valor limite de ABVT seja inferior aos 35 mg N/100g apontado pelo Regulamento (CE) N.º 2074/2005 para a espécie *Salmo salar*, famílias *Merluccidae* e *Gadidae*, sendo mais realista apontar um intervalo de valores entre 25 e 30 mg N/100g como limite para as amêijoas-boas, depuradas ou não.

Finalmente, e atentando nos resultados obtidos através da análise sensorial, considera-se que as amêijoas depuradas, cozidas ou cruas, são consideradas como aceitáveis para consumo durante mais tempo (+2,5 a 4,4 dias) do que as amêijoas não-

depurados (cujo  $t_{50}$  é 5,3 dias e 7,2 dias, respetivamente para espécimes crus e cozidos).

Por fim, seria pertinente apontar algumas perspetivas ou sugestões para um trabalho futuro que poderiam ajudar, por um lado, a colmatar algumas limitações que o presente trabalho possa apresentar e, por outro, expandir a análise a outros tópicos/abordagens que, por uma razão de *oportunidade*, não foi possível estudar para já.

As análises físico-químicas seriam enriquecidas com a realização das mesmas ao longo de 12 meses – ou, pelo menos, nas quatro estações – de modo a perceber-se mais aprofundadamente o efeito da sazonalidade sobre os vários aspetos da qualidade de amêijoas. A análise microbiológica do presente estudo poderia ser complementada com o estudo de mais grupos de microrganismos, como sejam as bactérias ácido-lácticas e as bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio ( $H_2S$ ) – numa perspetiva de estudo da deterioração – ou, por ex., *Vibrio* spp. – numa perspetiva de salubridade/saúde pública. A abordagem à análise sensorial que, embora tenha fornecido dados válidos e importantes, poderia ser revista e otimizada para que se tornasse mais “prática” e, portanto, utilizada. Para este última aplicação, será, eventualmente, oportuno trabalhar no sentido de desenvolver um esquema QIM (de *Quality Index Method*).

Outras metodologias de promoção da conservação, e.g. embalagem em atmosfera modificada recorrendo a diferentes composições de gases ou utilização da alta-pressão hidrostática (HPP), poderiam ser aplicadas às amêijoas e o seu efeito nos espécimes e no tempo-de-conservação-útil ser estudado.

## 6. Referências bibliográficas

- Abeyta, C. (2009). *Microbiology handbook fish and seafood* (Surrey: Leatherhead Publishing).
- Almeida, C., and Soares, F. (2012). Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): a 20 years of sanitary survey. *Marine Pollution Bulletin* 64, 252–262.
- Aníbal, J., Esteves, E., and Rocha, C. (2011). Seasonal Variations in Gross Biochemical Composition, Percent Edibility, and Condition Index of the Clam *Ruditapes decussatus* Cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *Journal of Shellfish Research* 30, 17–23.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., and Veciana-Nogués, T. (2002). Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8 degrees C) and stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6504–6510.
- Bandarra, N.M., Calhau, M.A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M.G., Bártolo, H., Faria, M.R., Fonseca, M.C., Gonçalves, J., and Batista, I. (2004). Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. *Publicações Avulsas Do IPIMAR* 11, 1–103.
- Barbosa, A., and Vaz-Pires, P. (2004). Quality index method (QIM): development of a sensorial scheme for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Control* 15, 161–168.
- Bebianno, M.J. (1995). Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Science of The Total Environment* 171, 107–115.
- Begon, M., Townsend, C.R., and Harper, J.L. (2006). *Ecology: From Individuals To Ecosystems* (Blackwell Publishing).
- Bernardino, F. (2001). *Amêijoa Boa: Caracterização Química e Plano HACCP para a Produção*. Universidade do Porto.
- Brackmann, A., Roberto, O., and Filho, C. (2004). *Maçã Pós-colheita. Série Frutas Do Brasil* 58–66.
- Cachola, R. (1997). Viveiros de amêijoa-boia - *Ruditapes decussatus* - da região Algarvia. *Ipimar* 1–15.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., and Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57, 469–476.
- Cao, R., Xue, C.H., Liu, Q., and Xue, Y. (2009). Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech Journal of Food Sciences* 27, 102–108.

- Castro, P., Padrón, J.C.P., Cansino, M.J.C., Velázquez, E.S., and Larriva, R.M. De (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* 17, 245–248.
- Crowley, H., Cagney, C., and Sheridan, J.J. (2005). Enterobacteriaceae in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. *Food Microbiology* 22, 409–414.
- DGPA (2007). Programa operacional pesca 2007-2013.
- DGPA (2011). Recursos da Pesca 2011.
- Egmond, H.P., Apeldoorn, M.E., and Speijers, G.J.A. (2004). Marine Biotoxins (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- El-Shenawy, N.S. (2004). Heavy-metal and microbial depuration of the clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology. *Environmental Toxicology* 19, 143–153.
- Emborg, J., Laursen, B.G., Rathjen, T., and Dalgaard, P. (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 92, 790–799.
- FAO (2012). Species fact sheets: *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758).
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., and Charnov, E.L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science (New York, N.Y.)* 293, 2248–2251.
- Gonçalves, A.C. (2010). Qualidade e valorização em aquacultura. Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves. Universidade de Lisboa.
- Goulas, A.E., and Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* 100, 287–296.
- Goulas, Chouliara, Nessi, Kontominas, and Savvaidis (2005). Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* 98, 752–760.
- Gram, and Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262–266.
- Gram, and Huss (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121–137.
- Gram, L., Ravn, L., and Rasch, M. (2002). Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78, 79–97.

Howgate, P. (2009). Traditional Methods. In *Fishery Products - Quality, Safety and Authenticity*, H. Rehbein, and J. Oehlenschläger, eds. (Wiley-Blackwell), p. 472.

Huss, H. (1988). *Fresh fish - quality and quality changes* (Rome: FAO).

ICMSF (1986). *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).

INE (2007). *Estatística da pesca 2006*.

IPIMAR (2006). *Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do Algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica. Relatórios Científicos e Técnicos*.

IPQ (1988). *Norma Portuguesa 2930 - Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT) pelo método de Conway*. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Costa da Caparica.

IPQ (1991). *Norma Portuguesa 4137 - Microbiologia Alimentar: Regras gerais para determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização. Técnicas do número mais provável e de contagem de colónias*. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Costa da Caparica.

IPQ (2002). *Norma Portuguesa 4405 - Microbiologia Alimentar: Regras gerais para contagem de microrganismos: Contagem de colónias a 30 °C*. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Costa da Caparica.

ISO (1999). *ISO 6887-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution. I*.

ISO (2001). *ISO 17410 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms - Colony-count technique at 6,5 °C*. International Organization for Standardization, Genève, Suisse.

ISO (2003). *ISO 6887-3 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*. International Orga.

Joosten, H., Marugg, J., Stephan, R., Klijn, A., Jackson, T., and Iversen, C. (2008). A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection of Enterobacteriaceae. *International Journal of Food Microbiology* 125, 344–346.

Lagartinho, J. (2010). *Estudo da deterioração da gamba Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846)*. Universidade do Algarve.

- Levin, R. (2010). Assessment of Seafood Spoilage and the Microorganisms Involved. In *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, L.M.L. Nollet, and F. Toldrá, eds. (CRC Press), pp. 515–536.
- Lucas, A., and Beninger, P.G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 187–200.
- Lund, B., Baird-parker, T., and Gould, G. (2000). *The Microbiological Safety and Quality of Food* (Maryland: Aspen Publishers).
- Maffei, M., Vernocchi, P., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E., Belletti, N., and Gardini, F. (2009). Depuration of Striped Venus Clam ( *Chamelea gallina* L.): Effects on Microorganisms, Sand Content, and Mortality. *Journal of Food Science* 74, M1–M7.
- Meilgaard, M., Civille, G., and Carr, B.T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques* (Florida, USA: CRC Press LLC).
- Mohite, Mohite, A.S., and Singh, H. (2009). On condition index and percentage edibility of the shortneck clam *Paphia malabarica* (Chemintz) from estuarine regions of Ratnagiri, west coast of India. *Aquaculture Research* 40, 69–73.
- Nychas, G.J.E., and Drosinos, E.H. (2010). Detection of fish spoilage. In *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, L.M.L. Nollet, and F. Toldrá, eds. (Boca Raton, FL.: CRC Press Inc.), pp. 537–555.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L., and Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238, 451–468.
- Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henehan, G., Nielsen, J., and Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* 8, 258–265.
- Oliveira, J., Cunha, a., Castilho, F., Romalde, J.L., and Pereira, M.J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. *Food Control* 22, 805–816.
- Orban, E., Di Lena, G., Nevigato, T., Casini, I., Caproni, R., Santaroni, G., and Giulini, G. (2006). Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chemistry* 101, 1063–1070.
- Ozcelik, B., Uygun, U., and Bayram, B. (2011). Seafoods and environmental contaminants. In *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*, C. Alasalvar, ed. (Blackwell Publishing Ltd), pp. 303–316.
- Ozogul, Y. (2010). *Handbook of seafood and seafood analysis* (CRC Press).
- Paterson, D.L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine* 119, S20–8; discussion S62–70.

- Pruzzo, C., Gallo, G., and Canesi, L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology* 7, 761–772.
- Range, P., Chícharo, M. a., Ben-Hamadou, R., Piló, D., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A.P., and Chícharo, L. (2011). Calcification, growth and mortality of juvenile clams *Ruditapes decussatus* under increased pCO<sub>2</sub> and reduced pH: Variable responses to ocean acidification at local scales? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 396, 177–184.
- Rawles, D.D., Flick, G.J., and Martin, R.E. (1996). Biogenic amines in fish and shellfish. *Advances in Food Nutrition and Research* 329–365.
- Ruano, F., Brito, B.G.P., Nunes, M.C., and Carneiro, A. (1998). Ensaio de certificação de um tanque experimental de depuração de bivalves. *Relatórios Científicos e Técnicos IPIMAR* 6–9.
- Ruby, J.R., and Ingham, S.C. (2009). Use of Enterobacteriaceae analysis results for predicting absence of Salmonella serovars on beef carcasses. *Journal of Food Protection* 72, 260–266.
- Ruiz-Capillas, C., and Moral, A. (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna *Thunnus obesus* during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry* 893, 347–354.
- Santos, S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 213–231.
- Serdar, S., Lök, A., Köse, A., Yildiz, H., Acarli, S., and Gouletquer, P. (2007). Growth and survival rates of carpet shell clam (*Tapes decussatus* Linnaeus, 1758) using various culture methods in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. *Aquacultural Engineering* 37, 89–99.
- Shalaby, A.R. (1997). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *29*, 675–690.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A., and Burt, J.R. (1990). Postharvest biochemical and microbial changes. In *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*, (Florida: CRC Press, Inc.),.
- Silva, H.A., and Batista, I. (2008). Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal. *Publicações Avulsas Do IPIMAR* 20, 171.
- Sobral, P., and Widdows, J. (1997). Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* ( L .), from southern Portugal. *61*, 163–171.
- Sobral, P., and Widdows, J. (2000). Effects of increasing current velocity, turbidity and particle-size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 245, 111–125.

Torres, J. (2011). Efeito de diferentes temperaturas de armazenamento na qualidade de moluscos bivalves vivos. Universidade de Lisboa.

Valiela, I. (1995). Marine Ecological processes (Springer-Verlag).

Xiao, Y. (2000). Modelling temperature-dependency in biology by generalizing temperature coefficient  $Q_{10}$ . *127*, 283–289.