

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia



QUALIDADE E VALORIZAÇÃO EM AQUACULTURA

Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves

Amparo Celeste Gonçalves

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA

(Bromatologia)

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia



QUALIDADE E VALORIZAÇÃO EM AQUACULTURA

Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves

Dissertação orientada por:

Investigadora Principal Eng^a Maria Leonor Nunes

Prof. Doutora Aida Duarte

Amparo Celeste Gonçalves

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA

(Bromatologia)

2010

PREÂMBULO

A aquacultura tem sido em anos recentes um dos segmentos de crescimento mais rápido da produção alimentar global. Assim, presentemente, cerca de metade do pescado para consumo humano a nível mundial provem da aquacultura e o número de espécies cultivadas tem vindo a aumentar. Todavia, a confiança dos consumidores, a adequação dos mercados e da produção são vitais para a rentabilidade económica das empresas, contribuindo para o sucesso e sustentabilidade do sector aquícola. Para além de melhorar as condições de produção, a estratégia de desenvolvimento deste sector passa seguramente por dar garantias aos consumidores e intervenientes na comercialização no que respeita à qualidade, inovar e diversificar os produtos, de modo a aumentar a produção de forma responsável e responder à procura.

A qualidade terá necessariamente de ir ao encontro das actuais exigências dos consumidores, mais conscientes da importância dos produtos alimentares na sua saúde e bem-estar. Deste modo, a caracterização da qualidade dos produtos de aquacultura em função dos factores de produção e pós-produção (manuseamento, acondicionamento/conservação, distribuição) revela-se indispensável.

A presente dissertação foca alguns aspectos da qualidade dos produtos de aquacultura, em particular as propriedades sensoriais e o período de conservação útil, em função dos factores que a podem influenciar, desde as condições de cultura ao manuseamento e conservação. Os resultados apresentados foram obtidos no âmbito do desenvolvimento de projectos de investigação, europeus e nacionais, com os seguintes objectivos:

1) Optimizar um esquema de avaliação sensorial que permita discriminar o grau de frescura e prever o período de conservação útil em gelo de linguado-do-Senegal, uma espécie emergente em aquacultura;

2) Avaliar o efeito do sistema de cultura na frescura de dourada, bem como no período de conservação útil em gelo;

3) Estudar o efeito da utilização de novas tecnologias de conservação na qualidade de amêijoabo e de produtos convenientes, preparados a partir de dourada e robalo, de modo a diversificar a apresentação, promover o seu consumo e introduzir valor acrescentado, contribuindo para a competitividade do sector aquícola;

4) Seleccionar os parâmetros mais adequados e propor indicadores de qualidade para cada espécie e tipo de produto.

A dissertação encontra-se estruturada em seis capítulos: 1. Introdução; 2. Material e Métodos; 3. Frescura e Conservação Útil em Gelo de Peixe de Aquacultura; 4. Inovação e Valorização dos Produtos de Aquacultura; 5. Considerações Finais e 6. Referências. Nos capítulos 3 e 4 apresentam-se, resumidamente, os principais resultados obtidos em diversos trabalhos, dos quais quatro se encontram publicados e um submetido em revistas científicas internacionais. Estes artigos apresentam-se no final da dissertação.

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho só foi possível pelo envolvimento de várias pessoas. A todas quero expressar o meu agradecimento, em especial:

À Eng^a Leonor Nunes, pela orientação científica deste trabalho, pelo apoio e incentivo durante a realização do trabalho experimental e elaboração da dissertação.

À Professora Aida Duarte, pela disponibilidade, apoio e colaboração na discussão, preparação e elaboração da dissertação.

À Alexandra Gameiro, Ana Rita Patarra e Carla Pestana, pela sua participação na parte experimental dos estudos de conservação em embalagem activa e estabilização em SGS.

Um agradecimento especial ao Carlos Cardoso, à Patrícia Anacleto e à Patrícia Oliveira pela sua colaboração na realização de algumas análises, no estudo de conservação de amêijoas-vivas.

Ao “meu” painel sensorial experiente, Carla Pires, Conceição Almeida, Helena Silva, Irineu Batista, José Pestana, Manuel Pires, Rogério Mendes e Rute Nelhas, pela sua disponibilidade, paciência e empenho na participação das diversas sessões de avaliação sensorial. A todos um agradecimento muito especial.

Ao Eng^o Irineu Batista, pela sua análise crítica, contribuindo para a melhoria dos trabalhos realizados.

A todos os colegas da Unidade de Valorização dos Produtos da Pesca e Aquicultura, INRB, I.P./L-IPIMAR, pelo apoio prestado e pelo companheirismo.

À Conceição Almeida, colega da sala de desenho do INRB, I.P./L-IPIMAR, pela elaboração do esquema de embalagem em atmosfera modificada.

Às pisciculturas Aqualvor, Rio Alto, TIMAR e Viveiros Vila Nova, S.A. e à Cooperativa Formosa, pela cooperação nos estudos realizados.

Às empresas Ovar Pack, Vaessen-Schoemaker, Portugal e Praxair Portugal Gases, S.A., pela oferta dos materiais de embalagem e dos gases utilizados.

ÍNDICE GERAL

	Página
Abstract	i
Resumo	ii
Lista de abreviaturas	iii
Índice de Quadros e Figuras	iv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância da aquacultura	1
1.2. Perspectivas futuras no sector da aquacultura	3
1.3. Qualidade dos produtos de aquacultura	4
1.4. Alterações da qualidade de pescado fresco	8
1.4.1. Alterações sensoriais	9
1.4.2. Alterações físicas e químicas	10
1.4.2.1. pH	10
1.4.2.2. Catabolismo nucleotídico	10
1.4.2.3. Compostos azotados voláteis	11
1.4.2.4. Aminas biogénicas	12
1.4.2.5. Proteínas e aminoácidos livres	12
1.4.2.6. Lípidos	13
1.4.3. Alterações microbiológicas	14
1.5. Avaliação da qualidade de pescado fresco - critérios de qualidade	15
1.6. Novas tecnologias de conservação	18
1.6.1. Embalagem em atmosfera modificada	19
1.6.2. Embalagem activa	21
1.6.3. Estabilização por gás dissolvido (SGS)	22
CAPÍTULO 2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Matéria prima	24
2.1.1. Linguado-do-Senegal (<i>Solea senegalensis</i>)	24
2.1.2. Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	24
2.1.3. Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	24
2.1.4. Amêijoia-boia (<i>Ruditapes decussatus</i>)	25
2.2. Material e equipamento de embalagem	25

	Página
2.2.1. Gases	25
2.2.2. Caixas de acondicionamento	25
2.2.3. Sacos de embalar	25
2.2.4. Absorventes de oxigénio	25
2.2.5. Absorventes de humidade	26
2.2.6. Câmara de alta pressão	26
2.2.7. Máquina de embalar	26
2.3. Métodos de conservação	26
2.3.1. Conservação em gelo	26
2.3.2. Conservação em embalagem activa	27
2.3.3. Pré-tratamento SGS combinado com embalagem sob vácuo	28
2.3.4. Conservação em atmosfera rica em oxigénio	30
2.4. Análises microbiológicas	30
2.4.1. Constituição e preparação da amostra	30
2.4.2. Preparação do diluente e meios de cultura	31
2.4.3. Enumeração de microrganismos viáveis totais (TVC)	31
2.4.4. Enumeração de <i>Pseudomonas spp.</i> (PSE)	31
2.4.5. Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	32
2.4.6. Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	32
2.5. Determinações físicas	33
2.5.1. Medição de gases	33
2.5.2. Medição do valor de pH	33
2.6. Análises químicas	33
2.6.1. Constituição e preparação da amostra	33
2.6.2. Composição química aproximada	34
2.6.3. Compostos azotados voláteis	35
2.6.4. Nucleótidos e catabolitos	36
2.6.5. Aminas biogénicas	37
2.6.6. Aminoácidos livres	37
2.6.7. Índice de peróxido (POV)	38
2.6.8. Determinação de aldeído malónico por colorimetria - TBARS	38
2.6.9. Determinação de aldeído malónico por HPLC	39

	Página
2.7. Avaliação sensorial	39
2.7.1. Avaliação da frescura em cru	40
2.7.2. Avaliação em cozido	43
2.8. Tratamento estatístico	44
CAPÍTULO 3. FRESCURA E CONSERVAÇÃO ÚTIL EM GELO DE PEIXE DE AQUACULTURA	46
3.1. Frescura e critérios de qualidade de linguado-do-Senegal	48
3.2. Influência das condições de cultura na frescura e conservação útil de dourada	49
CAPÍTULO 4. INOVAÇÃO E VALORIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AQUACULTURA	50
4.1. Dourada conservada em embalagem activa	52
4.2. Filetes de robalo e dourada pré-tratados em SGS	53
4.3. Amêijoia-boia viva conservada em atmosfera rica em oxigénio	54
CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS	59

Artigo 1. Freshness and quality criteria of iced farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*)

Artigo 2. Freshness and shelf life of iced farmed sea bream (*Sparus aurata*) as influenced by culture system

Artigo 3. Effect of oxygen absorber on the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*)

Artigo 4. Effect of soluble CO₂ stabilization and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets

Artigo 5. Effect of enriched oxygen atmosphere storage on the quality of live clams (*Ruditapes decussatus*)

ABSTRACT

At present aquaculture contributes to approximately half of the fish products consumed by the human population worldwide. Thus, the highest knowledge gained about the effects of production factors, such as culture system as well as the *post mortem* handling and storage conditions will open the possibility to improve the quality features of cultured fish and shellfish. In addition, the actual demand of consumers for convenient fresh fish products that offer healthy, tasty and fast meal solutions together with the need to upgrade the products from aquaculture induces the use of innovative technologies.

Therefore, the objective of the present work was to contribute to a better understanding of the role of several factors on the quality and shelf life of farmed fish products. The quality changes of an emergent species in aquaculture, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*), were assessed during the chill storage, in order to optimize the quality index method (QIM) and to establish sensory and chemical quality criteria. The effect of intensive and semi-intensive rearing conditions on the freshness and chill shelf life of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), was studied. Moreover, the quality of convenient fresh products, prepared from farmed sea bream and sea bass (*Dicentrarchus labrax*), was assessed and the effectiveness of innovative technologies, such as active packaging and the soluble gas stabilization (SGS) in the extension of shelf life of those products was also evaluated. The effectiveness of modified atmosphere packaging (MAP), using enriched oxygen gas mixture (70 % O₂/30 % N₂) on the quality of live clams (*Ruditapes decussatus*) was also studied.

The results allow establishing a shelf life of 14 and 15 days for gilthead sea bream and Senegalese sole and a QIM schemes, based on a total of 15 and 22 demerit points (dp), respectively, to discriminate the freshness and to predict the remaining shelf life in ice. Regarding sea bream, the freshness and the pattern of freshness decay during the chill storage were not significantly influenced by culture system.

Based on the significant correlations between sensory quality index (QI) and chemical index K_i, the following quality criteria were proposed for iced Senegalese sole and gilthead sea bream: QI values ≤ 4 demerit points (dp) and a K_i ≤ 6 % correspond to a very fresh fish whereas QI > 13 or 14 dp and K_i > 40 % indicate borderline quality of sea bream and Senegalese sole, respectively.

In relation to the upgrading of farmed fish products, the results evidence that fresh products ready to cook, prepared from sea bream and sea bass, have high potential to be introduced in the retail chain. The use of active packaging (oxygen absorbers) and SGS pre-treatment with CO₂, combined with vacuum packaging, provide an advantage for freshness and quality preservation of these products. A shelf life of 10 days at temperature ≤ 8 °C was established for such products.

A considerable benefit of enriched oxygen MAP storage was observed in the preservation of the freshness of live clams during six days at 6 °C in comparison with the conventional air storage. Further studies should be done to test longer storage periods in order to evaluate the effectiveness of this technology, in particular to extend the shelf life of live clams.

RESUMO

A proporção de pescado proveniente de aquacultura para consumo humano é cada vez maior. Ao mesmo tempo, o consumidor actual está mais consciente da importância dos produtos alimentares na sua saúde e bem estar, revelando exigências ao nível do valor nutricional e das propriedades sensoriais. Deste modo, é indispensável avaliar o impacto das condições de cultura e dos factores pós-produção na qualidade do pescado, proveniente de aquacultura, de modo a possibilitar uma intervenção conducente à sua melhoria. Neste contexto, assume especial relevância o efeito do manuseamento e as condições de conservação, bem como as condições de cultura, ao nível da frescura e período de conservação útil. Por outro lado, a crescente procura de produtos frescos, pré-preparados, a par da necessidade de valorização dos produtos provenientes de aquacultura, conduz necessariamente à aplicação de novas tecnologias de conservação.

Deste modo, com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para o conhecimento do efeito dos factores de produção e pós-produção na qualidade e no período de conservação útil de pescado proveniente de aquacultura. Assim, estudaram-se as alterações sensoriais de linguado-do-Senegal (*Solea senegalensis*), durante a conservação em gelo, com vista à optimização do esquema QIM e ao estabelecimento de critérios de qualidade. Avaliou-se o efeito do sistema de cultura na frescura e no período de conservação útil em gelo de dourada (*Sparus aurata*). Estudou-se ainda a qualidade de produtos convenientes, preparados a partir de dourada e robalo (*Dicentrarchus labrax*) e avaliou-se a eficácia de tecnologias de conservação inovadoras, designadamente a embalagem activa e o pré-tratamento de estabilização por dióxido de carbono (CO₂) dissolvido (SGS), na qualidade e no período de conservação útil dos produtos. Avaliou-se também o efeito da conservação em atmosfera modificada, rica em oxigénio (70 % O₂/30 % N₂), na qualidade de amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) viva. Os resultados permitiram estabelecer um período de conservação útil de 14 e 15 dias e otimizar os esquemas QIM, ajustados a 15 e 22 pontos de demérito (dp), úteis para a discriminação da frescura e previsão do tempo de conservação residual em gelo de dourada e linguado-do-Senegal, respectivamente. A correlação significativa entre o índice K_i e os dados sensoriais permitiu propor os seguintes critérios de qualidade: valores de QI ≤ 4 dp e K_i ≤ 6 % correspondem a elevada frescura enquanto que valores QI > 13 e 14 dp e K_i > 40 % indicam baixa qualidade, respectivamente para dourada e linguado-do-Senegal.

Em relação, à inovação e valorização dos produtos de aquacultura, os resultados obtidos evidenciaram a potencialidade de comercialização de produtos convenientes, prontos a cozinhar, preparados a partir de dourada e robalo. A utilização de embalagem activa (contendo absorventes de oxigénio) bem como a aplicação do pré-tratamento SGS, em combinação com a embalagem sob vácuo, constituíram uma vantagem na preservação da frescura e qualidade dos produtos desenvolvidos, verificando-se um período de conservação útil de 10 dias a temperaturas ≤ 8 °C.

A conservação de amêijoia-boia viva numa atmosfera rica em oxigénio permitiu preservar a qualidade sensorial, designadamente o sabor, até 6 dias de conservação a 6 °C, em comparação com a conservação convencional em ar, sugerindo o potencial benefício desta tecnologia na extensão do período de conservação útil desta espécie, de elevado valor comercial.

LISTA DE ABREVIATURAS

Na presente dissertação utilizam-se principalmente as abreviaturas dos termos em inglês.

ADP	Adenosina 5'-difosfato (adenosine 5'-diphosphate)
AGM	Agmatina (agmatine)
AMP	Adenosina 5'-monofosfato (adenosine 5'-monophosphate)
ATP	Adenosina 5'-trifosfato (adenosine 5'-triphosphate)
CAD	Cadaverina (cadaverine)
cfu/g	Unidade formadora de colónias por grama (colony forming unit per gram)
DHA	Ácido docosahexaenóico (docosahexaenoic acid)
dp	Pontos de demérito (demerit points)
EPA	Ácido eicosapentaenóico (eicosapentaenoic acid)
HIM	Histamina (histamine)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (high performance liquid chromatography)
Hx	Hipoxantina (hypoxantine)
IMP	Inosina 5'-monofosfato (inosine 5'-monophosphate)
Ino	Inosina (inosine)
MDA	Aldeído malónico (malnoaldheyde)
MPN	Número mais provável (most probable number)
OPA	Ortoftaldeído (o-Phthaldialdehyde)
OTMA	Óxido de trimetilamina (trimethylamine oxide)
OTMA-N	Azoto de óxido de trimetilamina (trimethylamine oxide nitrogen)
POV	Índice de peróxido (peroxide value)
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados (polyunsaturated fatty acids)
PUT	Putrescina (putrescine)
QI	Índice de Qualidade (Quality Index)
QIM	Método do Índice de Qualidade (Quality Index Method)
SSO	Organismos específicos da degradação (specific spoilage organisms)
TBA	Ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid)
TBARS	Índice do ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid-reactive substances)
TCA	Ácido tricloroacético (trichloroacetic acid)
TIR	Tiramina (tyramine)
TMA	Trimetilamina (trimethylamine)
TMA-N	Azoto de trimetilamina (trimethylamine nitrogen)
TVB-N	Azoto básico volátil total (total volatile basic nitrogen)
TVC	Microrganismos totais (total viable counts)
UE	União Europeia

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

	Página
Quadro 1. Produção e utilização mundial das pescas e aquacultura	2
Quadro 2. Produção aquícola em Portugal, referente ao ano de 2007	3
Figura 1. Relação entre qualidade e frescura nos produtos da pesca e aquacultura	5
Figura 2. Factores que afectam a qualidade final de pescado proveniente de aquacultura	6
Figura 3. Alterações da edibilidade de pescado durante a conservação em gelo	9
Figura 4. Degradação <i>post mortem</i> do ATP no músculo de pescado	11
Figura 5. Esquema do processo de autoxidação dos lípidos e os seus efeitos na qualidade de pescado	13
Figura 6. Esquema do método do índice de qualidade (QIM) para avaliação do grau de frescura de sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	16
Figura 7. Esquema do processo de embalagem de produtos alimentares em atmosfera modificada	19
Figura 8. Sistemas de embalagem activa, contendo absorventes de O ₂	21
Figura 9. Esquema do processo de estabilização por gás dissolvido (SGS)	23
Figura 10. Acondicionamento de linguado e dourada para ensaio de conservação em gelo	27
Figura 11. Preparação e acondicionamento de dourada no ensaio de conservação em embalagem activa	28
Figura 12. Etapas do processo de pré-tratamento SGS com CO ₂ de filetes de dourada e de robalo.	29
Figura 13. Esquema do ensaio de conservação de amêijo-a-bo-a viva em atmosfera modificada	30
Figura 14. Preparação das amostras para avaliação sensorial	40
Figura 15. Esquema sensorial QIM inicial usado na avaliação da frescura de linguado-do-Senegal	41
Figura 16. Esquema sensorial QIM usado na avaliação da frescura de dourada inteira e escamada/eviscerada	42
Figura 17. Escala usada na avaliação sensorial de filetes crus de dourada e robalo pré-tratados em SGS com CO ₂	42
Figura 18. Escala categórica usada na avaliação sensorial da frescura de amêijo-a-bo-a (crua), durante a conservação a 6,1 ± 0,7 °C	43
Figura 19. Escala Torry usada na avaliação sensorial em cozido de linguado-do-Senegal, de dourada (filetes) e de filetes de dourada e robalo pré-tratados em SGS	44
Figura 20. Escala categórica usada na avaliação sensorial de amêijo-a-bo-a cozida, durante a conservação a 6,1 ± 0,7 °C	45

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Importância da aquicultura

A aquicultura consiste na produção de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas (FAO, 2009a). Trata-se de uma actividade muito diversificada, que abrange uma vasta gama de espécies e práticas de produção, em águas doces, salobras e salgadas. Compreende diversos sistemas de cultura, desde o extensivo, no qual se aproveita exclusivamente as condições naturais disponíveis, incluindo o alimento. Neste regime, o cultivo de animais é feito em lagoas terrestres (salinas, lagoas de antigos moinhos de maré) em que o repovoamento é feito com os juvenis que entram com as marés, pelas comportas ou que são capturados em bancos naturais e posteriormente semados em zonas intertidais, lagunares e estuarinas, como é o caso dos bivalves em Portugal (IPIMAR, 2008).

Na cultura em regime semi-intensivo, utilizam-se tanques de terra batida, implantados em locais adequados. A produção é planificada, recorrendo-se à reprodução artificial (em maternidades), para obtenção de ovos e juvenis e a fase de engorda é monitorizada de modo a otimizar o crescimento. Aproveita-se o alimento natural existente no meio mas complementa-se a dieta com rações. A renovação da água realiza-se através de bombagem, embora nalguns casos se utilize parcialmente as marés (Henriques, 1998; FAO, 2009a). O oxigénio é fornecido por arejadores que também contribuem para aumentar a movimentação da massa de água. As densidades de cultivo são mais elevadas do que no regime extensivo, sendo em geral cerca de 1,5 kg/m³ atingindo no máximo 4 a 5 kg/m³.

O regime intensivo caracteriza-se pela utilização de elevadas densidades de peixe (chegando a atingir os 60 kg/m³) em tanques sintéticos, construídos em fibra de vidro ou betão, existindo um elevado índice de controlo de todos os parâmetros de produção (desde a reprodução e crescimento à qualidade da água), utilizando tecnologia e técnicas de maneo avançadas. A alimentação é assegurada exclusivamente por alimento artificial (Henriques, 1998; FAO, 2009a).

A actividade aquícola cumpre ainda objectivos sócio-económicos uma vez que é geradora de pequenas e médias empresas (FAO, 2009b; INE, 2009). Nos últimos anos, registou-se uma rápida expansão desta actividade a nível mundial, constituindo hoje o sector alimentar com o crescimento mais acentuado (crescimento médio anual de 6 a 8 %), atingindo uma produção global de cerca de 52 milhões de toneladas em 2006, o que representa uma expansão de um terço desde o início do milénio, isto é, em apenas 6 anos (Quadro 1).

No domínio da produção alimentar mundial, a aquicultura tem vindo a ocupar um papel cada vez mais significativo na satisfação das necessidades alimentares da população, devido ao estado de sobreexploração da maior parte dos recursos pesqueiros tradicionais. No ano de 2006, a produção aquícola representou aproximadamente 36 % da produção mundial de peixes, crustáceos e moluscos e contribuiu

para 47 % do pescado utilizado para consumo humano (FAO, 2009b). Em algumas regiões do mundo este sector constitui a única forma de assegurar o fornecimento de pescado às populações.

Na União Europeia (UE), o sector da aquacultura produz, em média, um total de 1,3 milhões de toneladas de produtos por ano, o que corresponde a um valor de cerca de 3,5 mil milhões de euros, representando 19 % da produção total de pescado na UE e 31 % do seu valor (CE, 2009).

Quadro 1. Produção e utilização mundial das pescas e aquacultura * (FAO, 2009b).

PRODUÇÃO (10⁶ t)	2002	2003	2004	2005	2006
ÁGUAS DOCES					
Pesca	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
Aquacultura	24,0	25,5	27,8	29,6	31,6
Sub-Total	32,7	34,4	36,7	39,3	41,7
ÁGUAS MARINHAS					
Pesca	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
Aquacultura	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
Sub-Total	100,9	98,7	103,8	103,4	102,0
TOTAIS					
PESCA	93,2	90,5	94,6	94,2	92,0
AQUACULTURA	40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
TOTAL GLOBAL MUNDIAL	133,6	133,2	140,5	142,7	143,7
UTILIZAÇÃO					
Consumo humano	100,7	103,4	104,5	107,1	110,4
Uso não alimentar	32,9	29,8	36,0	35,6	33,3
População (mil milhões)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
Fornecimento / consumo <i>per capita</i> de pescado (kg)	16,0	16,3	16,2	16,4	16,7

* Excluindo plantas aquáticas; t – toneladas

Em Portugal, a aquacultura tem tido um crescimento relativamente modesto, no conjunto do sector da pesca. Em 2007, a produção aquícola correspondeu a cerca de 5 % da quantidade de pescado capturado e descarregado no continente português. A produção em águas salobras e marinhas continua a ser a mais importante, representando 87 % da produção total (Quadro 2), assente principalmente na cultura de amêijoia-boia, dourada, robalo, truta-arco-íris e ostra. Os moluscos bivalves representam cerca de 42 % da produção total (INE, 2009).

Relativamente aos regimes de produção/exploração (sistemas de cultivo), predominam os de tipo extensivo, sobretudo na cultura de bivalves, enquanto que a produção de peixe, de água salgada, salobra e doce, se distribui principalmente pelos regimes semi-intensivo e intensivo (Quadro 2).

Quadro 2. Produção aquícola em Portugal, referente ao ano de 2007 (INE, 2009).

Principais espécies	Produção		Regime de exploração					
			Extensivo		Intensivo		Semi-intensivo	
	QT	Valor	QT	Valor	QT	Valor	QT	Valor
	t	1000 €	t	1000 €	t	1000 €	t	1000 €
TOTAL	7 449	40 605	3 298	21 258	2 346	10 117	1 804	9 230
Águas doces	937	2 251	0	0	937	2 251	0	0
Truta arco-íris	926	2 212	0	0	926	2 251	0	0
Trutas	11	38	0	0	11	38	0	0
Águas salobras e marinhas	6 512	38 354	3 298	21 258	1 409	7 866	1 804	9 230
Peixes	3 356	17 796	144	711	1 409	7 866	1 802	9 220
Atum rabilho	13	248	0	0	13	248	0	0
Corvina legítima	27	305	0	0	25	283	2	23
Dourada	1 930	9 163	117	557	828	3 931	985	4 676
Linguado legítimo	8	95	1	10	1	14	6	71
Pregado	167	1 340	0	0	167	1 340	0	0
Robalo legítimo	1 192	6 509	25	138	376	2 051	791	4 320
Diversos	19	131	1	6	0	0	18	125
Moluscos	3 156	20 558	31 53	20 548	0	0	3	10
Amêijoas	2 021	18 364	2 021	18 364	0	0	0	0
Berbigão	130	121	130	121	0	0	0	0
Mexilhões	290	135	290	135	0	0	0	0
Ostras	712	1 921	710	1 911	0	0	2	10
Diversos	3	16	3	16	0	0	0	0

QT – quantidade; t – toneladas; € – Euros

1.2. Perspectivas futuras no sector da aquacultura

É expectável que o crescimento verificado no sector aquícola nos últimos anos, a nível mundial, se mantenha no futuro, devido à escassez de recursos selvagens mas também porque a produção competitiva de muitas espécies com elevado valor comercial, constitui uma forte motivação em termos económicos. A aquacultura fornece produtos que a captura de espécies selvagens só consegue garantir pontualmente e a preços muito mais elevados, como é o caso da dourada, robalo e ostras. Por outro lado, a população mundial continua a crescer, cerca de 1 % ao ano (Quadro 1), pelo que é indispensável que a produção aquícola aumente, como forma de permitir o acesso a proteína animal a um custo razoável. O consumidor, por seu lado, também exerce pressão, ao procurar pescado em substituição da carne, pois

considera que é um alimento mais equilibrado (Damsgård, 2008a). Actualmente é possível produzir rações suplementadas com nutrientes, capazes de se acumularem no tecido muscular do pescado, que podem trazer benefícios para a saúde humana, como é o caso do selénio e das formas conjugadas do ácido linoleico (CLA) (Luten e Schram, 2006; Valente *et al.*, 2007).

Todavia, a aquacultura tem vindo a ser confrontada com uma série de problemas. A produção alimentar está a transformar-se num mercado cada vez mais competitivo, sendo a situação agravada pela flutuação da procura (CE, 2009). Além disso, o mercado dos produtos de aquacultura ficou saturado, relativamente a algumas espécies, provocando uma quebra nos preços e no rendimento dos produtores aquícolas.

No sentido de aumentar a competitividade do sector aquícola, a UE tem vindo a promover o desenvolvimento de investigação e tecnologia neste domínio, tendo disponibilizado cerca de 98 milhões de euros em projectos de investigação, no âmbito do 6º Programa Quadro (CE, 2009). Incluem-se nas prioridades da UE o aumento da produção e desenvolvimento dos mercados; a garantia de um elevado nível de qualidade e segurança dos produtos; a promoção do bem-estar animal e de práticas responsáveis de produção, designadamente do ponto de vista ambiental. A implementação destas medidas pressupõe novas atitudes por parte de todos os profissionais envolvidos nesta actividade, passando a utilizar novas técnicas de manejo, rações e estratégias alimentares mais eficazes, diminuindo os desperdícios lançados para o ambiente, bem como a aplicação de práticas de captura e de abate que inflingam menor *stress* aos animais, designadamente o recurso à insensibilização prévia ao abate.

No que respeita ao aumento da produção, desenvolvimento do mercado e garantia de produtos de qualidade, a estratégia consiste essencialmente em diversificar a oferta, através da introdução de novas espécies, cuja produção possa ser alternativa ou complementar à aquacultura já estabelecida, de forma a aumentar a competitividade e rentabilidade da actividade aquícola. Neste contexto, o desenvolvimento da produção de corvina, sargo, bacalhau, atum e linguado-do-Senegal à escala comercial tem uma grande importância, pelo elevado valor económico destas espécies.

É igualmente necessário criar alternativas de comercialização das espécies já estabelecidas, de forma a conseguir atenuar a saturação do mercado e diversificar a gama de produtos a oferecer ao consumidor. Os produtos convenientes, prontos a consumir ou cozinhar constituem alternativas que atraem o consumidor, actualmente mais exigente por produtos frescos, saudáveis e de fácil preparação (Damsgård, 2008a). Na preparação deste tipo de produtos, a aplicação de novas tecnologias de conservação, como a embalagem em atmosfera modificada (MAP) e, mais recentemente, a embalagem activa, entre outras, assume especial relevância, por estas permitirem manter a qualidade inicial dos produtos (incluindo a microbiológica) durante mais tempo e, eventualmente, prolongarem o seu período de conservação útil (Vermeiren *et al.*, 1999; Sivertsvik *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004).

1.3. Qualidade dos produtos de aquacultura

A qualidade dos produtos alimentares corresponde a um conceito, complexo, distinguindo-se diversas definições e abordagens. No entanto, reconhece-se um conjunto de atributos que claramente contribuem para a sua qualidade (Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Bremner, 2000), designadamente a capacidade de satisfação dos consumidores, a disponibilidade e conveniência (período de conservação útil,

embalagem), bem como o preço (Figura 1). Actualmente, os atributos éticos são de grande relevância para uma grande parte dos consumidores, sobretudo em países desenvolvidos, cuja relação com o alimento se alterou substancialmente no último século. Não havendo escassez de recursos alimentares, os consumidores passaram a ter preocupações quanto à sustentabilidade da produção e à forma como o produto alimentar é obtido. No caso dos produtos provenientes de aquacultura, em especial o peixe, as práticas de manejo e abate causam preocupação, quanto ao bem-estar animal (Damsgård, 2008b).

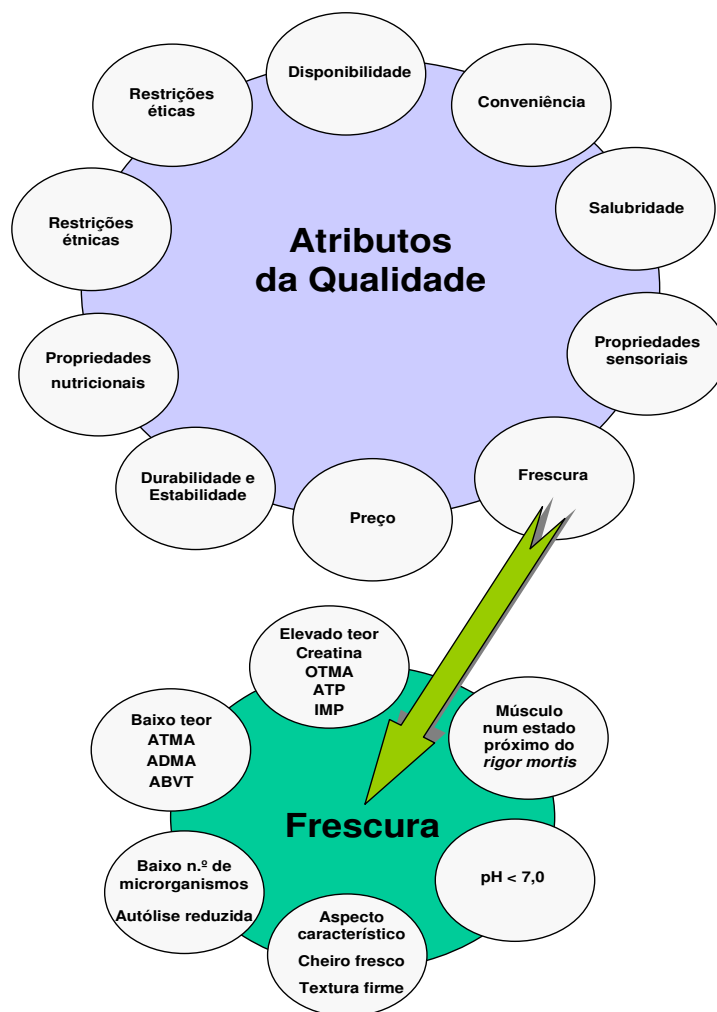


Figura 1. Relação entre qualidade e frescura nos produtos da pesca e aquacultura. Adaptado de Ólafsdóttir *et al.* (1997).

As propriedades sensoriais, o valor nutricional, a salubridade e frescura representam atributos muito especiais, sobretudo no caso do pescado, em que a frescura assume elevada relevância (Figura 1), pois determina a sua aceitabilidade pelo consumidor e conseqüentemente, o seu valor comercial.

Tal como para os produtos da pesca, a qualidade do pescado proveniente de aquacultura pode ser influenciada por diversos factores (Haard, 1992; Paterson *et al.*, 1997), nomeadamente factores genéticos, fisiológicos, ambientais (temperatura da água, salinidade, oxigénio dissolvido), sistema de cultivo, dieta, método de abate, manuseamento e condições de conservação *post mortem* (Figura 2).

As características genéticas, inerentes à espécie, sexo, idade e tamanho constituem factores importantes pois influenciam a estrutura muscular do peixe, designadamente o número e a densidade das fibras musculares, com possíveis consequências nas propriedades do músculo, em particular a textura (Johnston, 1999; Johnston, 2008).

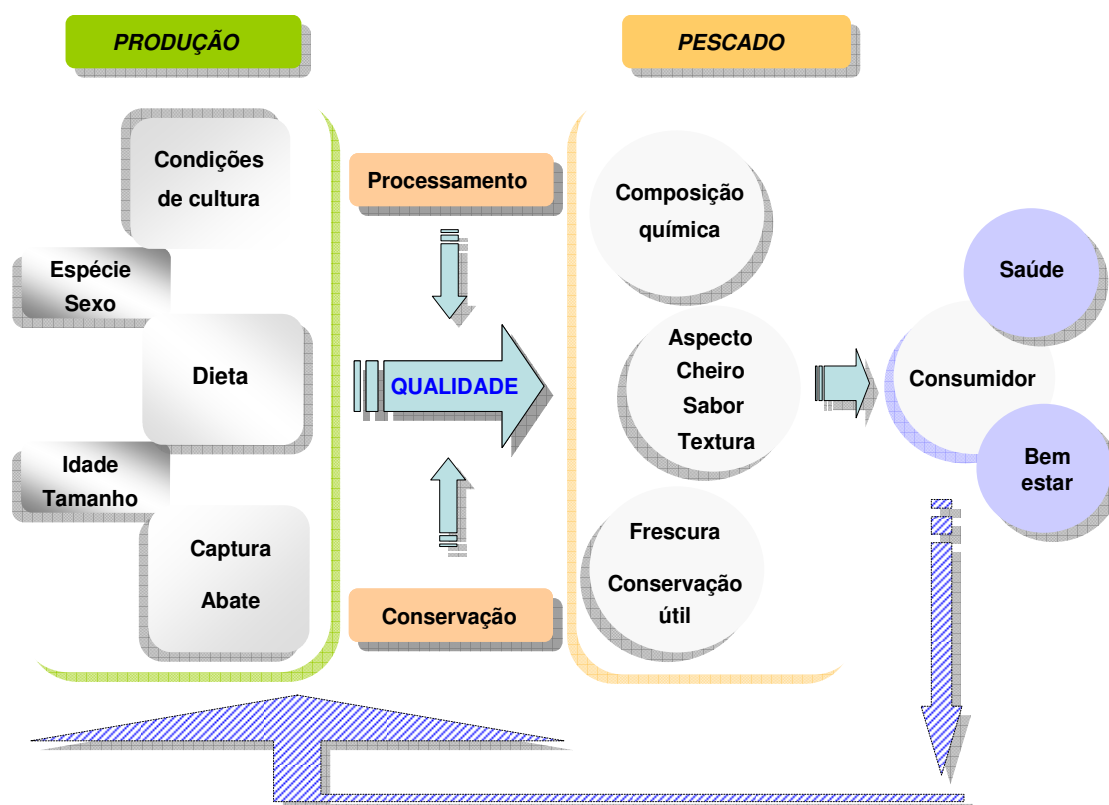


Figura 2. Factores que afectam a qualidade final de pescado proveniente de aquacultura.

A influência da dieta na composição do músculo do peixe, principalmente no que diz respeito ao teor de gordura e ao perfil de ácidos gordos encontra-se bem descrita, podendo afectar a composição química do músculo e por isso o seu valor nutricional, bem como as propriedades organolépticas (Love, 1980; Haard, 1992; Lie, 2001; Grigorakis, 2007). Em aquacultura, o factor nutrição é cada vez mais optimizado, através da diversificação na formulação das rações e das estratégias alimentares (por exemplo, restrição na quantidade de ração e ciclos de jejum, em especial antes do abate), com vista à optimização da produção (maior eficácia no crescimento e maiores taxas de sobrevivência), redução de custos e obtenção de um produto de maior qualidade.

Na cultura de espécies marinhas são tradicionalmente usadas rações cuja composição se baseia essencialmente em farinhas e óleos de peixe, ou seja, ricas em lípidos contendo elevados teores de ácidos gordos polinsaturados do tipo ómega-3 (n-3), em particular os ácidos eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA) e docosahexaenóico (22:6 n-3, DHA) (Sargent e Tacon, 1999). Todavia, a diminuição da disponibilidade dos recursos pesqueiros bem como a necessidade de diminuir os resíduos provenientes das rações, tem

conduzido à procura de fontes alternativas de proteínas e de lípidos, para substituição parcial ou total das farinhas e óleos de peixe. Esta substituição tem sido testada principalmente com ingredientes de origem vegetal, designadamente soja, milho, colza, entre outras (Regost *et al.*, 2003; Francesco *et al.*, 2004; Izquierdo *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2009). Actualmente a maioria das rações comerciais para peixe já incluem na sua composição mais de 30 % de proteínas de origem vegetal (Francesco *et al.*, 2004).

O efeito da alteração da composição das rações na composição química do peixe deve-se sobretudo ao tipo de matérias primas utilizadas, à sua qualidade e ao nível de inclusão. Em particular, o elevado nível de incorporação de óleos vegetais provoca a alteração do perfil de ácidos gordos do músculo do peixe, devido principalmente à diminuição dos teores de EPA e DHA e ao aumento do nível de ácidos gordos do tipo ómega-6 (n-6), em especial do ácido linoleico (18:2 n-6) (Regost *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2005). Esta situação pode desequilibrar o valor nutricional do pescado de aquacultura, designadamente o balanço entre os ácidos gordos n-3 e n-6, importante para a saúde humana (Simopoulos, 2004).

Relativamente à qualidade sensorial, a informação publicada é um pouco contraditória. Alguns trabalhos referem efeito da alteração da composição da ração principalmente ao nível do sabor e da textura (Francesco *et al.*, 2004; Izquierdo *et al.*, 2005; Grigorakis, 2007) enquanto que outros referem apenas um efeito ligeiro ou mesmo ausência de efeito (Hardy *et al.*, 1987; Guillou *et al.*, 1995; Bjerkgeng *et al.*, 1997; Montero *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007).

Também as condições de cultura, desde a temperatura da água, à densidade de cultivo e tipo de estruturas (tanques de terra, tanques de fibra, jaulas) têm sido factores referidos como potenciais condicionadores da qualidade final do peixe, em particular do aspecto exterior (pigmentação da pele) mas também da textura do músculo (Grigorakis, 2007; López-Albors *et al.*, 2008).

Do mesmo modo, o método de captura do peixe, as condições prévias ao abate e o próprio método de abate, são factores de grande impacto ao nível do bem-estar animal e da qualidade do produto final (Robb, 2002; Poli *et al.*, 2005; Damsgård, 2008b). O *stress* e os danos físicos, provocados durante a captura e o abate, podem afectar o aspecto da pele, bem como a composição química, o pH e as propriedades organolépticas do músculo (Paterson *et al.*, 1997; Robb, 2002). Assim, têm vindo a ser estudados métodos de abate alternativos, ao usual abate por imersão do peixe numa mistura de gelo e água (hipotermia), bem como práticas de insensibilização pré-abate, que possam garantir menor *stress*, com benefícios ao nível do bem-estar animal e da qualidade do produto, atendendo igualmente às preocupações éticas de alguns consumidores (van de Vis *et al.*, 2003; Poli *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2007; Damsgård, 2008b).

Os efeitos produzidos pelos diversos factores acima referidos podem influenciar não só a qualidade inicial do pescado proveniente de aquacultura, mas também o padrão de alterações que irá ter lugar durante a conservação e, conseqüentemente, o período de conservação útil (Huss, 1995; Paterson *et al.*, 1997). Este período (*shelf life*, em inglês) é definido como o tempo que medeia entre a captura ou abate e a rejeição, para consumo humano, de acordo com critérios pré-estabelecidos (Vaz-Pires *et al.*, 2005; Martinsdóttir *et al.*, 2009a). De acordo com Whittle e Howgate (2002) distinguem-se três critérios principais: i) sensorial - relacionado com a aceitação do produto pelo consumidor, ou seja, o produto não apresenta alterações no aspecto nem nas propriedades organolépticas; ii) nutricional – o produto não apresenta alterações do valor nutricional inicial e iii) microbiológico – diz respeito à segurança alimentar, isto é, o produto não apresenta perigo para a saúde do consumidor. Os dois últimos critérios são de inegável

importância, mas o critério sensorial assume particular relevância, pois está directamente relacionado com a aceitação e o valor comercial de um produto alimentar.

Por último, mas não menos importante, a satisfação das necessidades dos consumidores, constitui um factor condicionador da qualidade dos produtos de aquacultura, em toda a linha de produção (Figura 2).

1.4. Alterações da qualidade de pescado fresco

A deterioração do pescado deve-se ao efeito combinado de reacções químicas, devidas à actividade de enzimas endógenas e ao crescimento bacteriano (Huss, 1995; Oehlenschläger e Rehbein, 2009). Os termos fresco e deteriorado constituem extremos desta sequência de reacções autolíticas e bioquímicas, que ocorrem imediatamente após a morte, de forma progressiva e gradual.

Dada a poiquilotermyia do pescado, o metabolismo e flora bacteriana comensal estão adaptados a temperaturas mais baixas do que nos mamíferos. Desta forma, a refrigeração tem menor efeito na redução da deterioração, comparativamente com a carne (Huss, 1995; Church, 1998). A presença de elevada quantidade de água, o tipo de proteínas, o baixo teor de tecido conjuntivo (colagénio), em conjugação com a natureza psicrotrófica do microbiota, determinam a ocorrência de um conjunto de alterações que rapidamente contribuem para a desvalorização e rejeição do pescado (Huss, 1995). Em geral, as taxas de deterioração autolítica e microbiana são dependentes do nível inicial de contaminação microbiana, temperatura e condições de conservação. Deste modo, recomenda-se o arrefecimento do peixe à temperatura do gelo fundente (0 °C), o mais rápido possível após a captura (Huss, 1995).

Imediatamente após a morte, fase de *pre rigor*, o músculo de pescado contém quantidades apreciáveis de glicogénio, fosfocreatinina e adenosina 5'-trifosfato (ATP), dependentes do nível de esgotamento provocado pela captura e abate, apresentando-se flexível e elástico. Este período dura apenas algumas horas. Mais tarde o músculo contrai, devido à ligação irreversível e desordenada das principais proteínas contrácteis, miosina e actina (formando-se o complexo actomiosina), provocada pela diminuição dos níveis de ATP e aumento dos iões cálcio (Ca^{2+}), no sarcoplasma. Este processo altera as propriedades das proteínas e, conseqüentemente, a textura do músculo, que se torna duro, rígido e inextensível, caracterizando a fase de *rigor mortis* (Sikorski *et al.*, 1990; Huss, 1995; Tejada, 2009).

Esta condição normalmente persiste por algumas horas ou por mais de um dia, seguindo-se a resolução do *rigor mortis*, que se caracteriza pela recuperação da flexibilidade do músculo, embora já não exista a elasticidade característica da fase *pre rigor*. Pensa-se que esta fase é induzida pela actividade de certas enzimas, presentes no músculo, pois é coincidente com as alterações autolíticas, principalmente o catabolismo nucleotídico.

O intervalo que decorre entre o início (instalação) e a resolução do *rigor mortis* varia de espécie para espécie e é afectado pelo tamanho e condições físicas do peixe (condição nutricional e *stress*). É ainda muito influenciado pela temperatura e manuseamento durante a fase *pre rigor* e apresenta uma grande variabilidade entre indivíduos (Sikorski *et al.*, 1990; Huss, 1995). Este processo reveste-se de especial importância pelo papel que desempenha na frescura do pescado bem como nas suas potencialidades tecnológicas.

No caso de peixes famintos (cujas reservas de glicogénio estão esgotadas) e de peixes exaustos, o *rigor mortis* inicia-se imediatamente ou pouco tempo após a morte. Deste modo, as práticas de captura e

o método de abate podem influenciar o início do *rigor* (Roth *et al.*, 2007). O abate por imersão do peixe numa mistura de gelo e água permite obter mais rapidamente o início do *rigor mortis*, enquanto que um golpe na cabeça provoca um atraso, até 18 horas (Huss, 1995; Robb, 2002; Poli *et al.*, 2005).

1.4.1. Alterações sensoriais

As alterações sensoriais do pescado são muito influenciadas pela espécie, manuseamento após captura/abate, temperatura e método de conservação (Huss, 1995; Martinsdóttir *et al.*, 2009a). O aspecto (para o qual tem grande importância a pigmentação e brilho da pele), cheiro, textura e sabor são atributos determinantes para a sua edibilidade. Segundo Huss (1995), a deterioração de pescado refrigerado pode dividir-se em 4 fases distintas, que conduzem a alterações sucessivas da sua edibilidade (Figura 3).

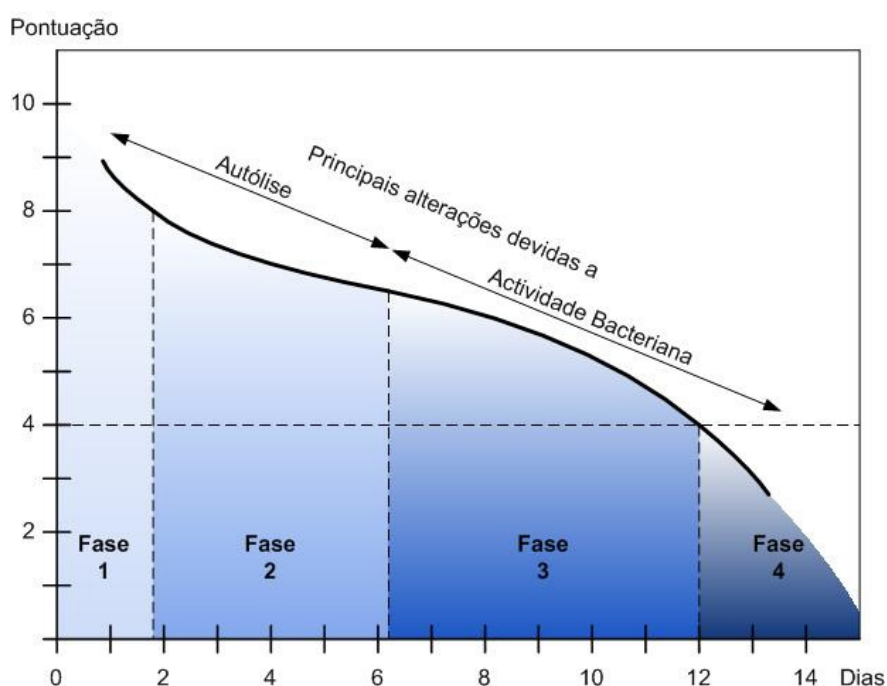


Figura 3. Alterações da edibilidade de pescado durante a conservação em gelo. Adaptado de Huss (1995).

Numa primeira fase o pescado é considerado muito fresco, com cheiro fresco, a maresia, no caso de espécies selvagens, e sabor adocicado (fase 1). A fase 2 caracteriza-se pela perda do cheiro e sabor característicos, mas ainda não são detectados cheiros desagradáveis e a textura ainda é firme e agradável. Estas alterações são o resultado principalmente da actividade autolítica. Na terceira fase, a textura torna-se mole e aquosa ou seca e fibrosa. Já existem sinais de deterioração como resultado da produção de vários compostos voláteis, desagradáveis, dependentes da espécie (da sua composição química) e do tipo de degradação (aeróbia ou anaeróbia), destacando-se cheiro forte a peixe, a amónia e alguns compostos sulfídricos. Em fases mais avançadas desenvolve-se cheiro a ranço, sobretudo nas espécies com elevado teor de gordura e o sabor é amargo. Na fase final (fase 4), o pescado é considerado

degradado e pútrido. As alterações ocorridas ao longo das fases 3 e 4 devem-se sobretudo ao metabolismo bacteriano.

1.4.2. Alterações físicas e químicas

1.4.2.1. pH

A glicólise *post mortem* anaeróbia resulta na acumulação de ácido láctico que reduz o pH do músculo. A quantidade de ácido láctico produzido está relacionada com a quantidade de glicogénio armazenado no tecido vivo. Em geral, o músculo dos peixes contém um nível de glicogénio relativamente baixo, em comparação ao dos mamíferos. Assim, depois da morte forma-se menor quantidade de ácido láctico, pelo que o valor de pH desce pouco. Valores de pH *post mortem* de espécies marinhas selvagens e de aquacultura encontram-se no intervalo 6,1 - 6,5 (Huss, 1995; Howgate, 2009).

Também o estado nutricional, a condição física (exercício) e o *stress* anterior à morte têm efeito nos níveis de glicogénio armazenado e, conseqüentemente, no pH final do músculo após a morte. Em regra, um peixe bem nutrido e relaxado contém mais glicogénio que um peixe exausto (Huss, 1995; Howgate, 2009).

A redução do pH do músculo do peixe após a morte tem efeito nas suas propriedades físicas. À medida que o pH decresce, ocorre uma desnaturação parcial das proteínas e estas perdem a capacidade de retenção da água, afectando a textura do músculo (Haard, 1992; Huss, 1995). Assim, o conhecimento do valor de pH no músculo do peixe pode fornecer informação importante acerca da sua condição. Este valor vai aumentando gradualmente durante o período de conservação, devido à formação de compostos químicos, em particular compostos azotados, como resultado das reacções autolíticas e bacterianas.

1.4.2.2. Catabolismo nucleotídico

Nos peixes vivos, o ATP está continuamente a ser sintetizado a partir do glicogénio (metabolismo aeróbio) e esgotado pelo seu uso na contração muscular e outros processos. Os teores de ATP variam bastante com a espécie, registando-se valores entre os 7 e 10 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, podendo, todavia, atingir valores mais altos. Depois da morte, os sistemas aeróbios que sintetizam ATP deixam de estar funcionais, no entanto a síntese anaeróbia deste nucleótido continua até o glicogénio estar esgotado e a degradação irreversível de ATP se iniciar. Quando a concentração de ATP desce abaixo de 1,0 $\mu\text{mol/g}$ de tecido o músculo entra na fase de *rigor mortis* (Sikorski *et al.*, 1990; Huss, 1995; Tejada 2009). A resolução do *rigor mortis* é um processo complexo que consiste na recuperação do relaxamento muscular e é coincidente com alterações autolíticas, em especial com o catabolismo dos nucleótidos.

A degradação do ATP segue um padrão bem definido (Figura 4) durante o qual ocorre a desfosforilação sucessiva dos diferentes nucleótidos, por perda de um grupo fosfato, com formação de adenosina 5'-difosfato (ADP) e adenosina 5'-monofosfato (AMP). Têm sido apontadas duas vias para a degradação do AMP, sendo que a via da sua desaminação a inosina 5'-monofosfato (IMP), que é desfosforilado a inosina (Ino), tem sido a mais verificada para peixes ósseos e invertebrados marinhos. No entanto, alguns autores verificaram que algumas espécies de crustáceos apresentam a via da desfosforilação do AMP a adenosina que é, posteriormente, desaminada a Ino (Sikorski *et al.*, 1990). Em

ambos os casos ocorre a formação de Hx, que pode ser degradada a xantina, com formação de ácido úrico.

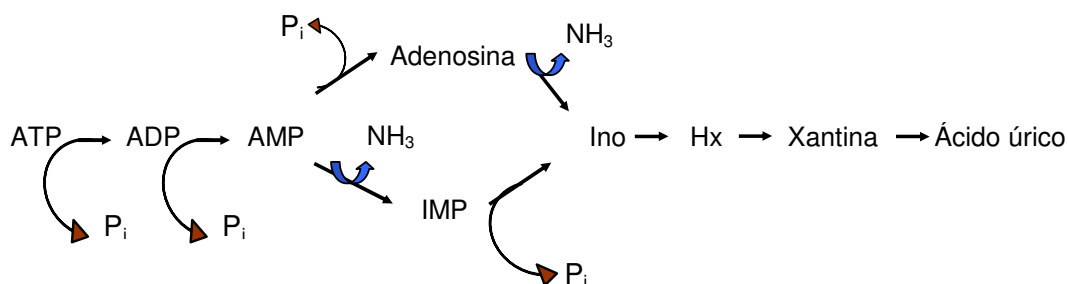


Figura 4. Degradação *post mortem* de ATP no músculo de peixe. Adaptado de Sikorski *et al.* (1990). ATP - adenosina 5'-trifosfato; ADP - adenosina 5'-difosfato; AMP - adenosina 5'-monofosfato; IMP - inosina 5'-monofosfato; Ino - inosina; Hx - hipoxantina; Pi - grupo fosfato.

Dependendo da temperatura e da espécie, a maioria dos nucleótidos de adenosina degrada-se rapidamente para IMP (Sikorski *et al.*, 1990; Howgate, 2006). Em muitas espécies, as primeiras reacções deste processo estão relacionadas com a actividade autolítica, enquanto que as enzimas de origem bacteriana contribuem numa fase mais avançada, estando a acumulação de Ino e de Hx relacionada quer com a actividade enzimática endógena quer bacteriana (Huss, 1995; Howgate, 2006; Tejada, 2009).

A acumulação de IMP é de particular importância já que este constitui um importante componente do sabor de peixe fresco, conjuntamente com outros compostos azotados não proteicos, como os aminoácidos livres presentes no músculo (Konosu e Yamaguchi, 1982; Sikorski *et al.*, 1990). A Hx contribui para um sabor moderadamente amargo e um elevado teor deste composto poderá provocar um sabor inaceitável no peixe.

1.4.2.3. Compostos azotados voláteis

Durante a conservação de peixe vão sendo produzidos compostos voláteis, que conferem cheiro desagradável. De entre eles, os compostos azotados revestem-se de grande importância, em especial a amónia e a trimetilamina (TMA) pois conferem cheiro tipo amoniacal e forte a peixe (desagradável), típicos de peixe deteriorado (Huss, 1995; Gram e Huss, 1996; Howgate, 2009). Estes compostos são resultantes das actividades autolíticas e bacterianas, sobretudo a TMA, que resulta da redução bacteriana do óxido de trimetilamina (OTMA), cuja concentração varia entre 1 e 5 % (em peso seco) nas espécies marinhas (Huss, 1995).

O OTMA ocorre naturalmente no ambiente marinho e dulçaquícola, apresenta pH neutro, não é tóxico e a sua principal função parece ser a de osmoregulação. Inicialmente a redução de OTMA deve-se à acção de enzimas endógenas, que cessa quando o fornecimento de oxigénio termina. No decorrer da conservação em gelo, a redução de OTMA a TMA deve-se geralmente à acção bacteriana, associada às espécies *Shewanella putrefaciens* e *Photobacterium phosphoreum* (Huss *et al.*, 1997). A TMA é um dos principais constituintes da fracção total dos compostos voláteis, designada por azoto básico volátil total (TVB-N), juntamente com a amónia e outras aminas voláteis (Howgate, 2009).

1.4.2.4. Aminas biogénicas

Estes compostos são sintetizados naturalmente nos organismos, nos quais exercem actividade biológica importante. A sua formação resulta normalmente da descarboxilação de aminoácidos livres, por remoção do grupo α -carboxil do aminoácido. Esta descarboxilação ocorre através de enzimas endógenas ou de origem bacteriana (Halász *et al.*, 1994; Mendes, 2009).

A presença de aminas biogénicas nos alimentos reveste-se de grande importância por dois aspectos fundamentais: deterioração e segurança alimentar. O consumo de alimentos contendo elevada concentração de aminas biogénicas, nomeadamente histamina (HIM) e tiramina (TIR), pode ter efeitos adversos, do tipo vasoactivo (TIR) e psicoactivo ou ambos (HIM) (Ten Brink *et al.*, 1990). As intoxicações mais frequentes estão relacionadas com a presença de HIM e com o consumo de produtos da pesca, designadamente sardinha, carapau, sarda, cavala e atum (Lehane e Olley, 2000; Mendes, 2009).

A possibilidade de utilizar a concentração destes compostos como um critério para a avaliação da qualidade de peixes ósseos e de invertebrados tem sido discutida por muitos investigadores, devido ao facto de poderem resultar da actividade de enzimas de origem bacteriana (Rawles *et al.*, 1996; Mendes, 2009). Os microrganismos com actividade descarboxilante podem fazer parte da flora inicial do produto ou podem ser introduzidos, por contaminação, durante a conservação e/ou processamento. São vários os grupos de bactérias aos quais tem sido associada actividade descarboxilante, designadamente Enterobacteriaceae, géneros *Clostridium* e *Lactobacillus* e *P. phosphoreum*, entre outros (Jørgensen *et al.*, 2000; Mendes, 2009). Existem vários factores que condicionam a produção de aminas, desde logo a disponibilidade de aminoácidos, a presença de microrganismos com actividade descarboxilante bem como a existência de factores que favoreçam esta actividade. Por exemplo, baixas temperaturas de conservação contrariam a formação destes compostos. As interações entre os microrganismos presentes no produto parecem desempenhar um papel fundamental na produção destes compostos (Ten Brink *et al.*, 1990; Jørgensen *et al.*, 2000).

1.4.2.5. Proteínas e aminoácidos livres

A autólise das proteínas musculares e do tecido conjuntivo (colagénio), por acção de proteases (principalmente catepsinas) e collagenases, resulta na libertação de péptidos de baixo peso molecular e de aminoácidos livres, que vão constituir substrato para o crescimento bacteriano (Sikorski *et al.*, 1990; Huss, 1995). O efeito da proteólise tem também sido associado às alterações da textura do músculo, designadamente, perda da firmeza e elasticidade (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). Todavia, inicialmente o pescado apresenta alguns aminoácidos já na forma livre, que conjuntamente com outros compostos, de baixo peso molecular, contribuem para o sabor característico de cada espécie (Konosu e Yamaguchi, 1982).

A taxa de degradação das proteínas musculares depende da espécie mas também das condições de conservação, podendo ter menor expressão durante a conservação em refrigerado, a temperaturas entre 1 e 5 °C, mas constitui um importante factor de alteração da qualidade do músculo de pescado durante a conservação em congelado (Sikorski *et al.*, 1990).

1.4.2.6. Lípidos

As alterações dos lípidos de pescado devem-se a reacções de hidrólise e de oxidação. A importância de cada uma destas reacções na alteração da qualidade de pescado depende sobretudo da espécie e da temperatura de conservação (Sikorski *et al.*, 1990; Huss, 1995; Kořakowska *et al.*, 2003).

A hidrólise dos lípidos ocorre por acção de enzimas endógenas, principalmente lipases digestivas (presentes no trato digestivo de pescado), pois a acção de enzimas de origem bacteriana tem pouco significado. Deste modo, a taxa de lipólise é mais rápida no caso de peixe inteiro do que no caso de peixe eviscerado ou filetes. Os produtos formados, os ácidos gordos livres, não afectam directamente as propriedades sensoriais, embora tenha sido referido que os ácidos gordos livres podem conferir um ligeiro sabor a sabão (Huss, 1995).

A oxidação lipídica desempenha um papel muito importante na alteração da qualidade de pescado, devido à elevada proporção de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na composição dos lípidos e ao seu grau de insaturação (Huss, 1995; Kořakowska *et al.*, 2003). A proporção de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados é variável com diversos factores, como a região geográfica, a temperatura, a maturação sexual e a dieta. No caso de espécies marinhas, os lípidos incluem na sua composição até 40 % de ácidos gordos de cadeia longa (≥ 18 átomos de carbono), muito insaturados, devido à presença de múltiplas ligações duplas (Jacobsen *et al.*, 2008).

A elevada percentagem de PUFA nos peixes torna-os muito susceptíveis à oxidação, que ocorre principalmente através de um mecanismo autocatalítico (autoxidação) iniciado por acção do oxigénio tripleto (3O_2), que envolve a formação de radicais livres e se caracteriza pelo facto dos produtos formados entrarem imediatamente na etapa seguinte da reacção, promovendo a sua progressão (Kořakowska, 2003; Jacobsen *et al.*, 2008), conforme se esquematiza na Figura 5.

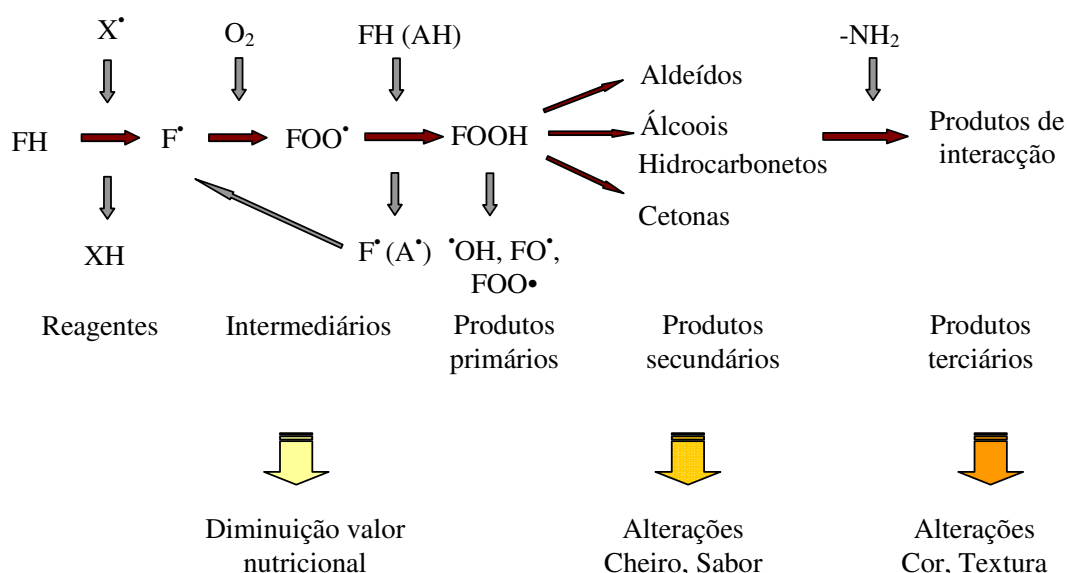


Figura 5. Esquema do processo de autoxidação dos lípidos e os seus efeitos na qualidade de pescado. FH – ácido gordo; X[•] - iniciador; F[•] - radical alquilo; FOO[•] – radical peróxido; FOOH – hidroperóxido; AH – antioxidante; •OH – radical hidroxilo; LO[•] - radical alcóxido. Adaptado de Jacobsen *et al.* (2008).

Esta propagação termina quando um dos radicais for removido, por reacção com outro radical ou com um antioxidante, cujo radical resultante (A') é menos reactivo. Este processo constitui o principal factor de alteração dos lípidos de pescado, podendo provocar modificações no valor nutricional, cheiro, sabor, cor e textura (Huss, 1995; Jacobsen *et al.*, 2008).

Os compostos oxidados primários, os hidroperóxidos (FOOH), não apresentam cheiro nem sabor, pelo que não são perceptíveis a nível sensorial. Por outro lado, são muito instáveis reagindo rapidamente com outros constituintes químicos.

Ao contrário, os compostos oxidados secundários, como por exemplo o aldeído malónico (MDA), são mais estáveis e a partir de determinadas concentrações são reponsáveis pelo sabor e cheiro a ranço (Jacobsen *et al.*, 2008). Muitos dos compostos secundários reagem com os grupos amina das proteínas e alguns aminoácidos, formando compostos terciários, que conferem coloração amarelada ou acastanhada ao músculo de pescado. As reacções com as proteínas alteram a estrutura proteica do músculo, com efeitos negativos nas suas propriedades texturais (Jacobsen *et al.*, 2008). Estas alterações ocorrem sobretudo durante a conservação em congelado.

Os efeitos da oxidação lipídica na qualidade do pescado dependem da extensão do processo, resultante do equilíbrio entre factores pró-oxidantes (exposição dos lípidos do pescado, presença de oxigénio activo, luz, iões metálicos) e antioxidantes, como o tocoferol e alguns carotenóides (Kołakowska, 2003; Jacobsen *et al.*, 2008).

1.4.3. Alterações microbiológicas

A primeira fase da deterioração do pescado é dominada por enzimas endógenas, enquanto a flora bacteriana da cavidade visceral, brânquias e pele não se adapta às alterações das condições ambientais (Huss, 1995; Gram e Huss, 1996). Num estado asséptico, o músculo estéril permanece com ligeiras alterações depois de atingir uma fase neutra, sem sabor, quando a maioria dos hidratos de carbono e nucleótidos presentes no músculo foram degradados por enzimas endógenas. A partir deste ponto, a maioria dos cheiros e outros sinais de deterioração surgem como resultado do metabolismo microbiano de constituintes solúveis em água, por exemplo aminoácidos livres. Em geral, apenas nas últimas fases, quando a deterioração já é avançada, existem compostos resultantes da acção de bactérias proteolíticas e lipolíticas, como aldeídos, cetonas, amónia e sulfureto de hidrogénio. O tempo de deterioração depende principalmente da temperatura de conservação e da espécie em questão (Huss, 1995; Gram e Huss, 1996).

A flora bacteriana de pescado de águas temperadas é dominada por bactérias Gram negativas psicotróficas (tolerantes a baixas temperaturas), pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella* e *Shewanella* e às famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae (Huss, 1995; Gram e Huss, 1996; Huss *et al.*, 1997), podendo encontrar-se em várias proporções bactérias Gram positivas dos géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium*. Apesar desta variedade, a importância dos microrganismos na deterioração do pescado, varia consideravelmente. Muitos deles estão presentes em pescado degradado, mas não têm um papel activo no processo. Apenas uma pequena fracção contribui para a deterioração, sendo designados por organismos específicos da degradação (SSO). Em condições particulares de temperatura, atmosfera, teor de sal, actividade da água, estes microrganismos crescem mais rapidamente do que os restantes, produzindo metabolitos

responsáveis por algumas das características sensoriais típicas de pescado degradado, designadamente o cheiro e o sabor. A bactéria *S. putrefaciens* é considerada o SSO de espécies de peixe conservadas em gelo, embora na flora deteriorante se encontrem também bactérias do género *Pseudomonas* (Gram e Huss, 1996; Huss *et al.*, 1997).

1.5. Avaliação de pescado fresco - critérios de qualidade

Na caracterização das alterações *post mortem* de pescado tem-se recorrido a métodos físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). Estes métodos revestem-se de grande importância para a definição de critérios de qualidade que permitam estabelecer o período de conservação útil de pescado.

A avaliação sensorial é definida como a disciplina científica usada para medir, analisar e interpretar reacções a características dos alimentos, através dos sentidos da visão, olfacto, paladar, audição e tacto (Meilgaard *et al.*, 1999). É considerado o método mais importante para avaliar a frescura de pescado (Howgate, 1982; Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Martinsdóttir *et al.*, 2009a).

A natureza subjectiva dos métodos sensoriais conduziu à optimização de esquemas de avaliação bem como ao treino de provadores, que permite familiarizá-los com as principais características sensoriais do produto a avaliar, de modo a conseguirem identificar, objectivamente, as alterações da qualidade. Este treino permite a selecção dos descritores mais adequados à avaliação de cada produto. A intensidade de cada um dos descritores pode ser avaliada por intermédio de diversas escalas (Meilgaard *et al.*, 1999; Martinsdóttir *et al.*, 2009b).

Um dos recentes esquemas de avaliação sensorial do grau de frescura de pescado, o método do índice de qualidade (QIM) procura ultrapassar as dificuldades surgidas na aplicação de tabelas menos objectivas (Nunes *et al.*, 2007; Martinsdóttir *et al.*, 2009b; QIM-Eurofish, 2009), tendo sido inicialmente desenvolvido para peixe inteiro, armazenado em refrigerado e, actualmente é aplicado, entre outros produtos, a filetes, peixe congelado e produtos já cozinhados.

O esquema QIM baseia-se na avaliação dos atributos que melhor traduzem as alterações que ocorrem no produto, por exemplo, no caso de peixe inteiro fresco, aspecto da pele, designadamente a pigmentação e brilho, forma dos olhos, cor e cheiro das brânquias. Para cada um dos atributos é seleccionado um conjunto de descritores que melhor reflectem as alterações ocorridas, aos quais é atribuída uma pontuação que varia entre 0 e 3 pontos de demérito (dp). Os descritores correspondentes ao estado de maior frescura são pontuados com 0, enquanto que os respeitantes à perda de qualidade mais avançada são classificados com 2 ou 3 pontos (Figura 6). Somando os pontos de demérito atribuídos a todos os descritores obtem-se o Índice de Qualidade (QI). Assim, o QI de peixe muito fresco é zero e vai aumentando à medida que a deterioração prossegue, verificando-se uma evolução linear deste índice em função do tempo de conservação (Nunes *et al.*, 2007; Martinsdóttir *et al.*, 2009b; QIM-Eurofish, 2009). Uma vez estabelecida esta evolução, bem como o tempo máximo de conservação (período de conservação útil), definido a partir da avaliação sensorial em cozido, é possível estimar o tempo de conservação residual, isto é, o período em que o pescado armazenado nas mesmas condições ainda é aceitável para consumo.

ATRIBUTOS DE QUALIDADE		DESCRITORES	PONTOS DE DEMÉRITO
Aspecto Geral	Pele	Iriscente, brilhante	0
		Menos brilhante	1
		Baça	2
	Firmeza da carne	Firme, elástica	0
		Firme	1
Ligeiramente mole		2	
Olhos	Córnea	Límpida, transparente	0
		Ligeiramente ensanguentada	1
		Ensanguentada	2
	Pupila	Preta, circular	0
		Preta, um pouco distorcida	1
	Forma	Ligeiramente convexa	0
Achatada		1	
Opérculos	Sufusões hemorrágicas	Pequenas manchas (0-10 %)	0
		Algumas manchas (10-50 %)	1
		Forte presença (>50 %)	2
Brânquias	Cor	Vermelha escura	0
		Vermelha acastanhada	1
		Castanha (descoradas no bordo)	2
	Cheiro	Algas, fresco	0
		Metálico, neutro	1
	Ligeiramente rançoso	2	
	Rançoso	3	
Abdómen	Parede abdominal	Firme, intacta	0
		Ligeiramente mole, intacta	1
		Mole, com marcas, roturada	2
ÍNDICE DE QUALIDADE (Total de Pontos de Demérito)			0-18



Figura 6. Esquema do método do índice de qualidade (QIM) para avaliação do grau de frescura de sardinha (*Sardina pilchardus*). Adaptado de Nunes *et al.* (2007).

Na avaliação sensorial de pescado cozido recorre-se frequentemente às tabelas descritivas Torry (Howgate, 1982; Martinsdóttir *et al.*, 2009b; QIM-Eurofish, 2009), principalmente para avaliação do cheiro e do sabor. Em geral, a pontuação varia entre 10 e 3 pontos, correspondendo a peixe muito fresco e deteriorado, respectivamente. Esta classificação tem sido usada para determinar a rejeição sensorial de pescado e como critério para definição do período de conservação útil.

Apesar da avaliação sensorial constituir o método mais importante para avaliação da frescura de pescado, os métodos químicos fornecem informação complementar e alguns trabalhos evidenciam correlações significativas entre os dados sensoriais e químicos. A desfosforilação do ATP tem sido usada como um indicador químico de frescura de pescado (Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Tejada, 2009). Uma vez que a produção de IMP é predominantemente autolítica, a sua concentração pode constituir um indicador da frescura de algumas espécies de peixe, antes do início da proliferação bacteriana. Pelo contrário, a acumulação de Hx resulta da actividade de enzimas endógenas e bacterianas, pelo que a determinação deste composto pode constituir um indicador do período de vida útil. No entanto, é necessário ter em conta que o ATP no músculo é degradado e convertido a IMP muito rapidamente e que as concentrações dos seus intermediários são muito variáveis (Sikorski *et al.*, 1990; Tejada, 2009). Assim, prestou-se especial atenção à concentração dos catabolitos finais da degradação do ATP, a Ino e a Hx. A extensão desta degradação é expressa através do índice K, que é a razão entre as concentrações dos catabolitos Ino e Hx

e a concentração total de todos os compostos relacionados com o ATP (Saito *et al.*, 1959 citado em Karube *et al.*, 1984):

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

Para peixe muito fresco, em que as concentrações de Ino e Hx são baixas, o valor K será baixo e para a grande maioria das espécies, aumenta linearmente com o tempo de conservação em gelo. Este índice fornece uma taxa de frescura relativa, baseada, principalmente, nas alterações autolíticas que tomam lugar no músculo após a morte. O principal propósito de determinar o valor K é o de obter um índice específico que reflecta quantitativamente o estado de frescura do peixe, e desta forma possa servir de critério de frescura (Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Tejada, 2009). No entanto, a taxa de catabolismo dos nucleótidos é muito variável com a espécie, com os indivíduos, método de captura e de abate, época do ano, manuseamento e condições de conservação. Deste modo, é necessário determinar com rigor a taxa de degradação nucleotídica para cada espécie (Howgate 2006; Tejada, 2009). Dada a rápida autólise do ATP a IMP, Karube *et al* (1984) sugeriram um índice K simplificado (K_i ou K_1), que exclui o ATP e os catabolitos intermediários, devido ao facto da sua concentração ser frequentemente vestigial:

$$K_i (\%) = \frac{[Ino] + [Hx]}{[IMP] + [Ino] + [Hx]} \times 100$$

Este índice modificado tem sido muito utilizado por facilitar a avaliação da qualidade e se correlacionar bem com o valor K tradicional (Tejada, 2009).

As aminas voláteis, como a TMA, estão presentes no pescado fresco acabado de capturar, em níveis muito baixos e acumulam-se em estados de conservação mais avançados, dependendo das espécies, da temperatura, do tempo e da higiene (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). No início, o OTMA pode ser reduzido a TMA, por enzimas endógenas e mais tarde, por acção de enzimas de bactérias Gram negativas (Huss, 1995; Gram e Huss, 1996), pelo que a concentração elevada de TMA-N tem sido considerada como indicador principalmente de deterioração, contribuindo para o cheiro amoniacal desagradável, presente em pescado num estado de deterioração mais avançado. Em muitas espécies o desenvolvimento de TMA é paralelo à produção de Hx (Huss, 1995).

Usualmente, utiliza-se o doseamento de TVB-N para avaliação da qualidade de pescado, indicando o seu nível de deterioração, uma vez que desta forma se determina a concentração conjunta de amónia e de TMA. A Comissão Europeia, através do Regulamento (CE) 2074/2005, estabeleceu que a determinação de TVB-N deve ser usada na inspecção de pescado, quando a avaliação sensorial suscitar dúvidas sobre o grau de frescura, fixando limites para diferentes grupos de espécies de peixes, que se situam entre 25 – 35 mg N/100 g (CE, 2005).

A elevada concentração de PUFA nos peixes torna-os muito susceptíveis à oxidação, podendo causar alterações das propriedades sensoriais, designadamente no cheiro e sabor (ranço) bem como na

textura e coloração do músculo, que se torna mais acastanhada (Huss, 1995; Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Jacobsen *et al.*, 2008). A oxidação lipídica inicia-se logo após a morte do peixe, sendo particularmente importante no caso da conservação em congelado. De entre os diversos métodos disponíveis para avaliar o nível de oxidação lipídica, o índice de peróxido (POV) e o índice do ácido tiobarbitúrico (TBARS) são vulgarmente utilizados como indicadores da formação de compostos oxidados primários e secundários, respectivamente (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). No entanto, dada a elevada instabilidade química dos primeiros (hidroperóxidos), reagindo facilmente com outros, o POV pode não constituir um bom indicador e, frequentemente, não se obtém boa correlação entre estes valores e os resultados sensoriais.

A maior parte dos compostos secundários, como o MDA, reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um composto corado que absorve num comprimento de onda de 530 nm. Deste modo, o índice TBARS tem sido muito utilizado para estimar a oxidação lipídica de diversas matrizes alimentares (Shibamoto, 2006). Uma vez que o valor de TBARS inclui o aldeído malónico é frequente expressar-se o resultado em mg MDA/kg. Dada a importância do MDA como marcador de peroxidação lipídica, têm sido desenvolvidos métodos analíticos, com maior especificidade, robustez e exactidão, para a sua separação e doseamento, como a cromatografia gasosa ou líquida (Shibamoto, 2006). Os compostos terciários, podem ser determinados por colorimetria, fluorescência e, numa fase mais avançada, por observação directa, devido à coloração acastanhada do músculo.

O número de SSO, bem como a concentração dos seus metabolitos, podem ser usados como índices de qualidade objectivos para a determinação do tempo de conservação útil de pescado refrigerado (Gram e Huss, 1996; Ólafsdóttir *et al.*, 1997). A correspondente correlação para os microrganismos viáveis totais (TVC) é razoável mas apenas para baixos valores iniciais. Desta forma, existe uma fraca correlação entre o tempo de conservação útil e os TVC em pescado. Sempre que possível, devem ser usados os valores de SSO para a estimação do tempo de conservação útil de pescado fresco. No entanto, não é fácil determinar o conjunto de bactérias responsável pela deterioração de pescado, exigindo extensos estudos sensoriais, microbiológicos e químicos (Huss *et al.*, 1997). Assim, recorre-se frequentemente aos valores de TVC para definição do período de conservação útil, usando como critério o limite 10^7 cfu/g de microrganismos totais, fixado para pescado não processado (ICMSF, 1986; IFST, 1999).

1.6. Novas tecnologias de conservação

A eficácia de uma tecnologia de conservação depende da sua capacidade para inibir ou retardar as reacções que conduzem à deterioração de um determinado produto alimentar (sensoriais, químicas e microbiológicas) e que limitam o período de conservação útil (Sivertsvik *et al.*, 2002). A necessidade de preservação de alimentos, mantendo as suas propriedades sensoriais e nutricionais, bem como a apetência dos consumidores para produtos convenientes, fáceis de preparar, conduziu ao desenvolvimento de tecnologias de conservação inovadoras, alternativas às técnicas de conservação tradicional. Deste modo, surgiram diversas tecnologias, térmicas e não térmicas, capazes de inactivar os microrganismos degradativos e patogénicos, manter a qualidade do produto e até prolongar o período de conservação útil. São exemplos, as altas pressões, os pulsos eléctricos, a utilização de substâncias naturais, com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, entre outros (Devlieghere *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2009). Acresce que algumas destas tecnologias emergentes parecem ter claros benefícios do ponto de

vista ambiental (Pereira e Vicente, 2009). Todavia, apesar da intensa investigação desenvolvida nesta área, verifica-se uma fraca implementação a nível industrial, talvez devido, entre outras causas, aos elevados custos iniciais e à ausência de regulamentação sobre a sua aplicação (Devlieghere *et al.*, 2004; Pereira e Vicente, 2009).

As novas tecnologias não são igualmente aplicáveis e eficazes em todos os produtos alimentares, pelo que tem sido muito aplicado o conceito de *tecnologia barreira* (*hurdle technology*). Este conceito baseia-se na aplicação simultânea de diferentes técnicas de conservação (“barreiras”), normalmente suaves, obtendo-se efeitos sinérgicos, de modo a prolongar a qualidade e garantir a segurança dos produtos e, em muitos casos, prolongar o seu período de conservação útil, contribuindo para a minimização de perdas económicas (Leistner e Gorris, 1995; Leistner, 2000). Neste conceito inclui-se a utilização de embalagem, convencional ou em atmosfera modificada, uma vez que é um elemento crucial na conservação e comercialização dos produtos alimentares, evitando a sua contaminação (Vermeiren *et al.*, 1999). A aplicação da maioria destas tecnologias emergentes, isoladamente ou em combinação, permite obter produtos convenientes considerados frescos (ou minimamente processados), que são do agrado do consumidor actual, com maior exigência em relação a produtos alimentares saudáveis e seguros (Brunsø *et al.*, 2008).

1.6. 1. Embalagem em atmosfera modificada

A tecnologia MAP convencional consiste na colocação do produto alimentar numa embalagem, de baixa permeabilidade aos gases, procedendo-se à evacuação do ar, seguida da injeção de um gás ou uma mistura de gases e selagem da embalagem (Figura 7). A embalagem sob vácuo, sem a adição de gases inclui-se no conceito de embalagem MAP.

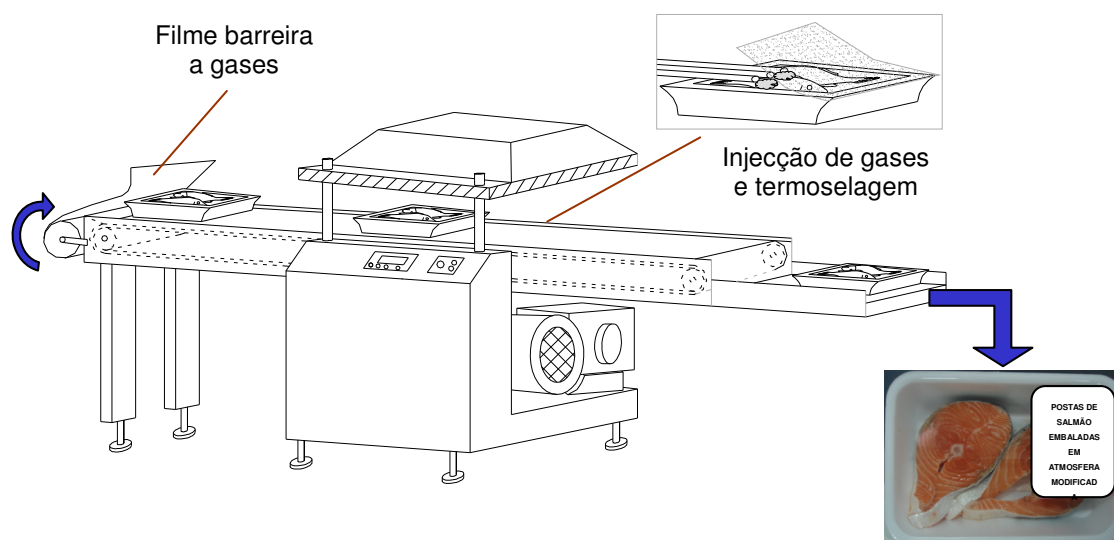


Figura 7. Esquema do processo de embalagem de produtos alimentares em atmosfera modificada (elaborado por Conceição Almeida).

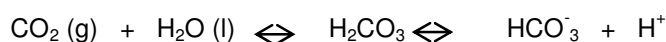
Não se exerce controlo posterior sobre a composição gasosa no interior das embalagens e, naturalmente, a concentração dos gases altera-se com o tempo, devido à dissolução no produto, à difusão e aos efeitos do próprio produto, nomeadamente o metabolismo microbiano. Deste modo, para obter um benefício notório desta tecnologia, a razão gás:produto é muito importante, sendo comum a utilização de razões de 1:1 e 2:1 na conservação de pescado utilizando embalagem MAP (Stammen *et al.*, 1990; Church, 1998; Sivertsvik *et al.*, 2002).

As misturas gasosas consistem usualmente em dióxido de carbono (CO₂), oxigénio (O₂) e azoto (N₂), em diferentes combinações e proporções, dependendo do teor de gordura e da microflora capaz de crescer no produto (Church, 1998; Sivertsvik *et al.*, 2002). Estas condições reduzem significativamente a deterioração do produto, possibilitando muitas vezes uma extensão do período de conservação útil. Tem sido referido um período de conservação útil de 3 a 14 dias, dependendo do produto (Church, 1998; Sivertsvik *et al.*, 2002). Em comparação com outros alimentos, como a carne, este prolongamento é marginal, sendo compensado pela melhoria no manuseamento e apresentação do produto.

A utilização de elevadas concentrações de CO₂ em pescado é geralmente evitada pois têm sido referidas algumas alterações sensoriais, designadamente ao nível da textura e da cor associadas a este facto, pelo que é frequente a utilização de misturas contendo 40 a 60 % CO₂, em combinação com N₂, em espécies com elevado teor de gordura e 40 % CO₂/30 % N₂/30 % O₂ em espécies consideradas magras e crustáceos (Stammen *et al.*, 1990; Church, 1998; Sivertsvik *et al.*, 2002).

O CO₂ (solúvel em água e em gordura) é o principal gás responsável pelo efeito bacteriostático das atmosferas modificadas, que se traduz na extensão da fase de latência dos microrganismos e no decréscimo da taxa de crescimento durante a fase logarítmica. Para a obtenção de um efeito bacteriostático máximo a temperatura deve ser mantida próxima de 0°C, uma vez que a solubilidade do CO₂ aumenta inversamente com a temperatura.

O efeito inibidor do CO₂ no crescimento bacteriológico aeróbico é causado pela dissolução do CO₂ no músculo, segundo a equação seguinte (Sivertsvik *et al.*, 2002):



Este efeito é influenciado por vários factores, designadamente pelo tipo e fase de crescimento dos microrganismos presentes inicialmente, temperatura de armazenamento, tipo de produto, pressão parcial e concentração do CO₂, volume de gás contido na embalagem (razão gás:produto), valor de pH e actividade da água (Farber, 1991; Sivertsvik *et al.*, 2002).

O O₂ estimula o crescimento de bactérias aeróbias e poderá inibir o crescimento de bactérias estritamente anaeróbias, embora exista elevada variabilidade da sensibilidade dos microrganismos anaeróbios ao oxigénio (Farber, 1991). A presença de oxigénio pode provocar problemas de oxidação dos lípidos, sobretudo em pescado com elevado teor de gordura. Por este motivo, é aconselhável a utilização nestes produtos de misturas binárias de CO₂ e N₂ (Church, 1998; Sivertsvik *et al.*, 2002).

O N₂ é usado principalmente para evitar o colapso das embalagens, sobretudo quando se utilizam atmosferas com elevada concentração de CO₂, e como substituto do O₂ de forma a retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento de microrganismos aeróbios (Farber, 1991).

A maior preocupação relativa aos produtos conservados em MAP coloca-se ao nível da segurança alimentar, sobretudo em atmosferas com baixa concentração de O_2 , devido ao potencial crescimento e produção de toxinas pelas estirpes não proteolíticas do tipo E de *Clostridium botulinum* (Reddy *et al.*, 1992; Gram, 2001; Sivertsvik *et al.*, 2002). Este perigo potencial reveste-se de grande gravidade devido à elevada toxicidade da toxina botulínica e à capacidade das estirpes produtoras crescerem e produzirem toxinas a temperaturas tão baixas como 3,3 °C, sem a produção de sinais evidentes de deterioração. Todavia, este perigo coloca-se sobretudo no caso de produtos prontos a consumir, sem confecção culinária que envolva a aplicação de calor (ICMSF, 1996; Gram, 2001).

1.6.2. Embalagem activa

Nos últimos anos assistiu-se ao desenvolvimento de inovações na tecnologia de embalar alimentos, capazes de melhorar a qualidade geral e, em particular, a segurança dos produtos. O desenvolvimento da embalagem activa e da embalagem inteligente constituem exemplos destas inovações. A primeira técnica permite modificar a atmosfera da embalagem a partir do seu interior, visando principalmente o retardamento das reacções de deterioração e consequente extensão do período de conservação útil, enquanto que a embalagem inteligente contém sistemas (geralmente enzimáticos) indicadores da qualidade do produto, como, por exemplo, integradores de tempo-temperatura e indicadores da concentração de O_2 e CO_2 no interior das embalagens (Ozdemir e Floros, 2004).

Os diferentes sistemas de embalagem activa incluem absorventes de humidade, emissores de CO_2 , absorventes de O_2 , agentes anti-microbianos, antioxidantes ou outros, que vão sendo libertados de saquetas, previamente introduzidas na embalagem, ou do próprio material de embalagem (filmes activos), (Devlieghere *et al.*, 2004; Ozdemir e Floros, 2004), conforme se ilustra na Figura 8.

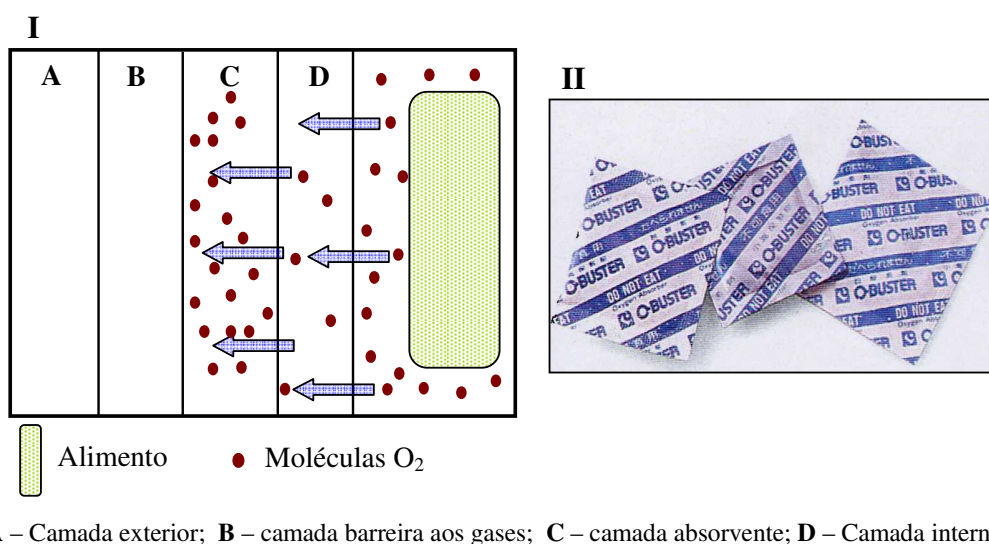
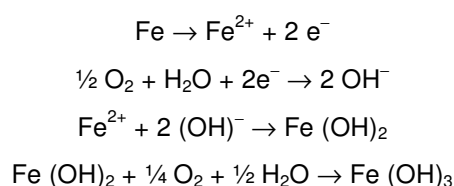


Figura 8. Sistemas de embalagem activa, contendo absorventes de O_2 , incorporados em filmes de embalar (I) ou em saquetas (II), para introdução na embalagem com o produto alimentar. Esquema de filme activo adaptado de Ozdemir e Floros (2004).

Os absorventes de O₂ representam o sistema de embalagem activa mais utilizado (Devlieghere *et al.*, 2004) em diversos produtos alimentares, por constituírem uma forma de embalar em MAP, com custos reduzidos, uma vez que não requer a utilização de equipamento específico para evacuação do ar ou injeção de gases nas embalagens. Em geral, incluem na sua composição substâncias químicas que reagem com o O₂, reduzindo a sua concentração residual até valores inferiores a 0,01 %. Deste modo, possibilitam um controlo eficaz do crescimento bacteriano e dos processos oxidativos, que provocam perda do valor nutricional e alterações da cor e sabor dos alimentos (Ozdemir e Floros, 2004). A maior parte dos absorventes de O₂ são comercializados na forma de saquetas, que contêm ferro como composto activo e o O₂ residual da embalagem é usado para formar óxido de ferro, de acordo com a equação seguinte (Vermeiren *et al.*, 1999):



A presença de água é essencial para que o absorvente funcione, existindo diversos tipos de acordo com o teor de humidade do produto alimentar. A taxa de absorção de O₂ é função da temperatura, quanto mais elevada mais rapidamente ocorre a reacção, da capacidade do absorvente e do teor de humidade do produto. Os absorventes à base de ferro possuem uma capacidade de absorção máxima após 24 horas de exposição, à temperatura ambiente. Esta absorção é retardada nos produtos conservados a 0 – 5 °C.

1.6.3. Estabilização por gás dissolvido (SGS)

Outra das inovações na tecnologia MAP convencional consiste na aplicação de CO₂ previamente à embalagem dos produtos alimentares. Este processo é designado por estabilização por gás dissolvido (SGS, em inglês soluble gas stabilisation) e consiste na aplicação de um gás, usualmente o CO₂, a pressões elevadas (≥ 2 bar), sob temperaturas próximas de 0 °C, de forma a aumentar a solubilidade do gás no produto alimentar (Sivertsvik *et al.*, 2004a,b). O processo decorre num recipiente fechado, adequado à aplicação de pressões elevadas do gás a utilizar, com volume e temperatura constantes, de acordo com o esquema apresentado na Figura 9.

A relação entre o nível de CO₂ na atmosfera do recipiente e a quantidade de CO₂ dissolvida no produto, a temperatura constante, é dada pela Lei de Henry (Sivertsvik *et al.*, 2004b):

$$P_{\text{CO}_2}^{t \approx \infty} = H_{\text{CO}_2, \text{prod}} \times C_{\text{CO}_2}^{t \approx \infty}$$

em que:

$P_{\text{CO}_2}^{t \approx \infty}$ - Pressão parcial de CO₂ (Pa)

$C_{\text{CO}_2}^{t \approx \infty}$ - CO₂ dissolvido no equilíbrio (mg/kg produto)

$H_{\text{CO}_2, \text{prod}}$ - Constante de Henry, específica de cada produto alimentar (Pa/ppm)

Ou seja, no equilíbrio, a quantidade de CO₂ dissolvido no produto, depende da solubilidade do gás, que aumenta linearmente com a sua pressão parcial. No entanto, a taxa a que o CO₂ é transferido para o produto alimentar depende do coeficiente de difusão do gás nesse produto (a difusão de um gás nos tecidos animais é menor do que num líquido). Assim, o fluxo de CO₂ difundido num produto alimentar, como carne ou pescado, pode ser estimado através da segunda Lei de difusão de Fick (Sivertsvik *et al.*, 2004a, b):

$$\frac{\partial C_{CO_2}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{CO_2}}{\partial x^2}$$

em que: D – coeficiente de difusão efectivo, característico do produto alimentar (cm²/s); concentração C_{CO₂} - concentração de CO₂ dissolvido (mg/kg produto); t – tempo (s); x – posição difusional (cm).

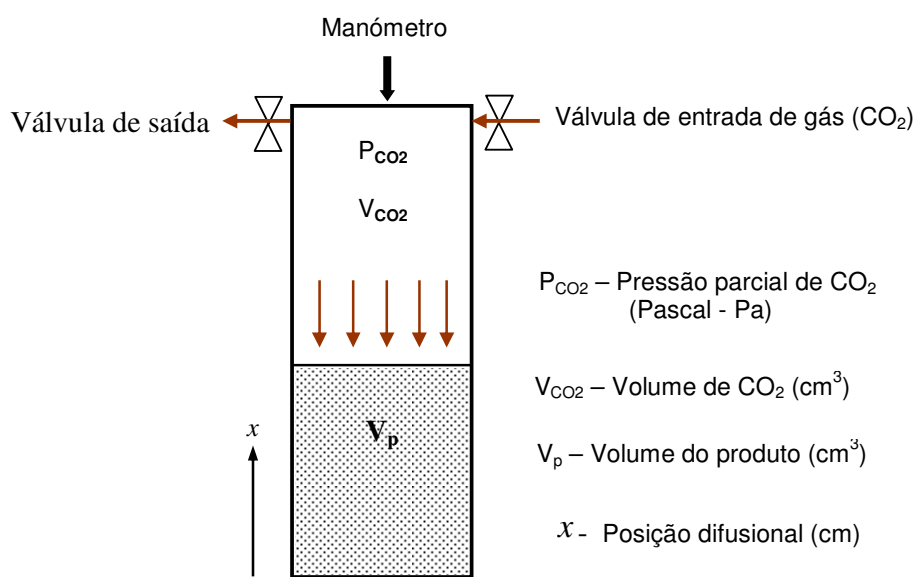


Figura 9. Esquema do processo de estabilização por gás dissolvido (SGS), ilustrando a difusão do CO₂. Adaptado de Sivertsvik *et al.* (2004a).

O pré-tratamento SGS com CO₂ pode ser considerado a primeira barreira à deterioração do produto, sendo normalmente complementado com a embalagem sob vácuo ou numa mistura adequada de CO₂/O₂/N₂. Neste último caso, é possível a utilização de menores razões gás:produto, devido ao efeito residual do CO₂ (Sivertsvik *et al.*, 2004a). Tendo em conta que na embalagem MAP convencional chega a ser necessário usar razões de 2:1 e 3:1, obrigando à utilização de embalagens bastante volumosas, o pré-tratamento SGS pode constituir uma vantagem, uma vez que pode possibilitar o mesmo benefício tecnológico, com redução dos custos associados aos materiais de embalagem.

CAPÍTULO 2.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima

2.1.1. Linguado-do-Senegal (*Solea senegalensis*)

Os linguados utilizados no estudo de conservação em gelo (artigo 1) eram provenientes das pisciculturas Aqualvor (Algarve) e Rio Alto (Póvoa do Varzim). A captura foi efectuada após um período de jejum de 24 horas e o abate foi realizado por hipotermia, através da imersão do peixe numa mistura de gelo e água. Após o abate, o peixe foi acondicionado em gelo, em caixas isotérmicas e transportado para o IPIMAR, em Lisboa. A entrega ocorreu até 18 horas após o abate.

2.1.2. Dourada (*Sparus aurata*)

No estudo do efeito do sistema de cultivo na qualidade de peixe proveniente de aquacultura (artigo 2), utilizaram-se douradas produzidas em diferentes pisciculturas, representando três sistemas de produção: tanques e jaulas (produção intensiva) e tanques de terra (produção semi-intensiva), codificados como IT1,IT2 e IJ e SI1, SI2 e SI3, respectivamente. Os seis grupos de peixe, foram capturados após um período de jejum de 24 horas e abatidos da forma usual, numa mistura de gelo e água, segundo as práticas usadas em cada piscicultura. Após o abate, o peixe foi acondicionado em gelo, em embalagens de poliestireno e transportado para o laboratório, tendo sido entregue num período de 24 horas após o abate, excepto no caso do grupo IJ, cuja recepção ocorreu 72 horas após o abate.

As douradas usadas no estudo de embalagem activa (artigo 3) e na preparação de filetes pré-tratados em SGS (artigo 4) eram provenientes da piscicultura TIMAR (Tavira, Portugal). O peixe foi capturado após um período de jejum de 48 horas e abatido por imersão numa mistura de gelo e água. Após o abate, o peixe foi transportado para o laboratório em caixas de poliestireno com gelo. O tempo decorrente entre a captura e a entrega não ultrapassou 24 horas.

2.1.3. Robalo (*Dicentrarchus labrax*)

Os robalos utilizados na preparação de filetes pré-tratados em SGS (artigo 4) eram provenientes da piscicultura TIMAR (Tavira Portugal) e foram capturados após um período de jejum de 48 horas e abatidos por imersão numa mistura de gelo e água. O peixe foi mantido em gelo, em caixas de poliestireno e transportado para o laboratório, no prazo de 24 horas.

2.1.4. Amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*)

A amêijoia-boia viva, designada de calibre médio, utilizada no estudo de conservação em atmosfera modificada (artigo 5), era proveniente da Ria Formosa e foi gentilmente cedida pela Cooperativa Formosa (Algarve). Após depuração, os animais vivos foram acondicionados da forma usual, em sacos de rede de 1 kg e enviados para o laboratório em transporte refrigerado.

2.2. Material e equipamento de embalagem

2.2.1. Gases

O CO₂ aplicado no pré-tratamento SGS de filetes de robalo e dourada e a mistura gasosa (70 % O₂/30 % N₂) usada na conservação de amêijoia-boia em MAP eram de grau alimentar e foram fornecidos pela empresa Praxair Portugal Gases, S.A.

2.2.2. Caixas de acondicionamento

As cuvetes utilizadas no acondicionamento dos produtos embalados eram de polietileno e foram fornecidas pela empresa Ovar Pack-Embalagens S.A. (Ovar, Portugal). Utilizaram-se cuvetes de 370 µm de espessura, com dimensões externas (comprimento, largura e altura) de 220x170x45 mm e de 220x170x25 mm, respectivamente para a dourada conservada em embalagem activa e para os filetes pré-tratados em SGS.

2.2.3. Sacos de embalar

Os sacos de embalar (adequados ao uso alimentar), utilizados nas embalagens de dourada, de filetes pré-tratados em SGS e de amêijoia-boia eram constituídos por uma camada de poliamida (barreira aos gases) e duas de polietileno. Apresentavam 140 µm de espessura e taxas de transmissão gasosa de 25,0; 61,0 e 8,8 cm³/m²/24 h, a 75% HR (humidade relativa) e 23 °C, respectivamente para o O₂, CO₂ e N₂ e de vapor de água de 2,0 g/m²/24 h, a 100% HR e 38 °C. Os sacos foram fornecidos pela empresa Vaessen-Schoemaker (Ovar, Portugal).

2.2.4. Absorventes de oxigénio

Os absorventes de O₂ utilizados nas embalagens activas de dourada eram de uso alimentar e continham óxido de ferro como princípio activo (O-Buster, Dessicare, Inc., Mississippi, USA). Utilizou-se uma saqueta FT300, correspondente a uma capacidade de absorção de aproximadamente 300 cm³ de O₂. A escolha da capacidade do absorvente teve em conta o volume residual de O₂ na embalagem final, contendo duas douradas, escamadas e evisceradas (peso total aproximado de 450 g), calculado em ensaio prévio, como indicado a seguir:

$$\text{Volume residual O}_2 \text{ (cm}^3\text{)} = [\text{Volume embalagem (cm}^3\text{)} - M_D \text{ (g)} / G_{\text{esp.}}] \times 1/5$$

em que: Volume embalagem = Volume cuvete + Volume do saco de embalar =
= 31 cm (comprimento) x 17 cm (largura) x 5 cm (altura) = 2 635 cm³
M_D = Massa de dourada = 450 g
G_{esp.} = Gravidade específica de um produto, assume-se = 1
1/5 = proporção de O₂ no ar atmosférico (aproximadamente 21 %)

Assim, volume residual O₂ = (2635 cm³ – 450 g) x 1/5 = 437 cm³

2.2.5. Absorventes de humidade

Utilizaram-se absorventes de humidade (dimensões: 20 cm x 15 cm x 0,2 cm) nas embalagens de dourada e filetes pré-tratados em SGS, fornecidos pela empresa Ovar Pack-Embalagens S.A. (Ovar, Portugal).

2.2.6. Câmara de alta pressão

O pré-tratamento SGS dos filetes de robalo e dourada efectuou-se numa câmara de alta pressão, em aço inox (Ø 50 cm, comprimento 74 cm), construída pela empresa Sandometal (Lisboa, Portugal). A câmara apresenta duas válvulas para permitir o fluxo de gases.

2.2.7. Máquina de embalar

As embalagens activas de dourada, dos filetes pré-tratados em SGS e de amêijoia-boia foram seladas numa máquina de embalar marca Multivac modelo A 300/52 (Multivac Sepp Haggemuller KG, Wolfertschwenden, Alemanha). No caso dos filetes, procedeu-se à evacuação parcial do ar (40 mbar) previamente à soldadura das embalagens.

2.3. Métodos de Conservação

2.3.1. Conservação em gelo

Realizaram-se ensaios de conservação em gelo com linguado-do-Senegal e com dourada produzida em regime intensivo e semi-intensivo. Após a recepção do peixe, procedeu-se ao seu acondicionamento em caixas plásticas, cobriu-se o peixe com uma película de plástico, sobre a qual se colocou uma camada de gelo em escama (Figura 10). As caixas tinham o fundo perfurado, de modo a permitir a drenagem da água de fusão do gelo. Procedeu-se à reposição do gelo sempre que necessário. As caixas foram armazenadas numa câmara frigorífica, regulada para temperaturas entre 0 e 2 °C. Monitorizou-se a temperatura a cada 30 minutos, através de sondas automáticas (Digitron, MonologTM Datalogger), colocadas em cima das caixas contendo o peixe (Figura 10).

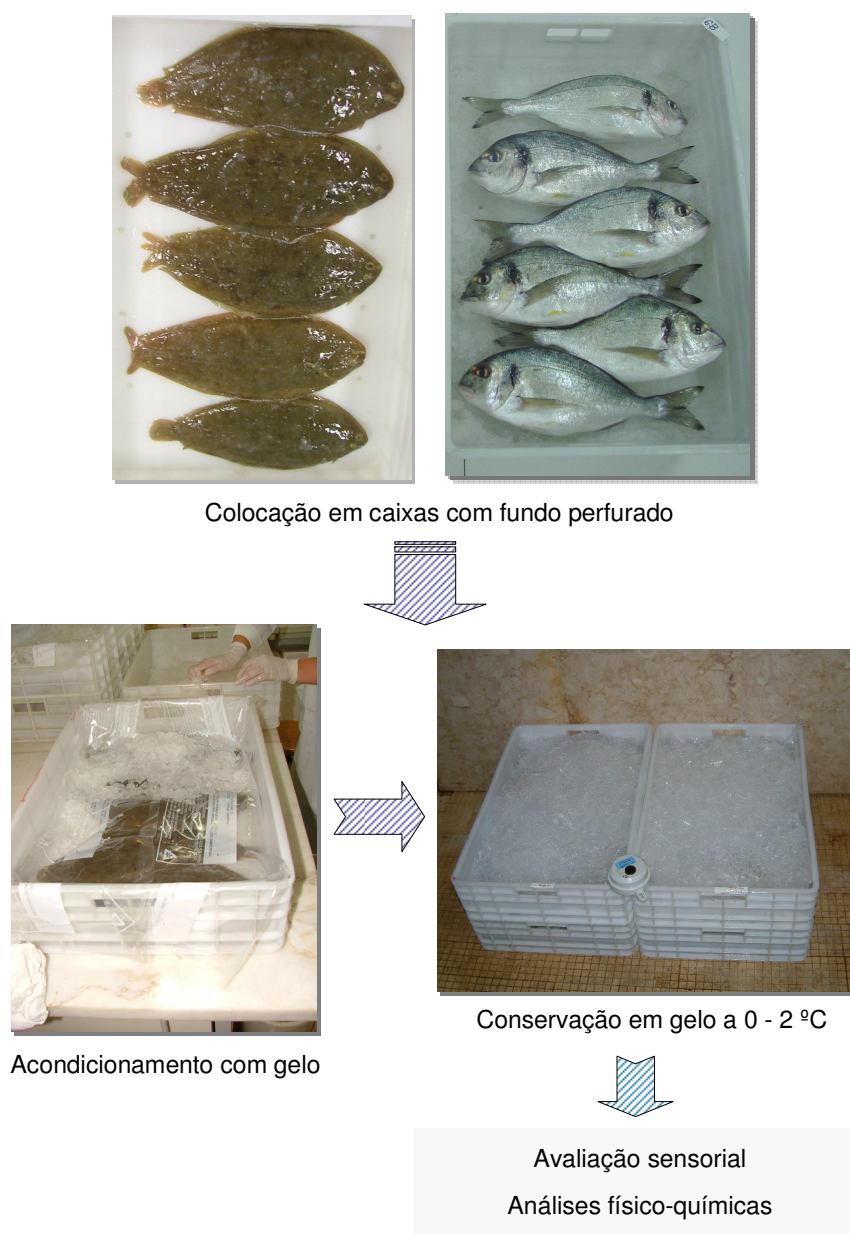


Figura 10. Acondicionamento de linguado e dourada para ensaio de conservação em gelo, em câmara refrigerada a 0 – 2 °C.

2.3.2. Conservação em embalagem activa

As douradas foram escamadas e evisceradas (Figura 11 A). De seguida, foram lavadas com água corrente e escurridas. Colocaram-se duas douradas em cada cuvette (correspondente a um peso médio de 450 g), sobre o absorvente de humidade, juntamente com uma saqueta de absorvente de O₂ FT300 (lote FTE - Figura 11 B). As cuvetes foram colocadas dentro de sacos de embalar, que foram soldados na máquina de embalar Multivac A 300/52 (Figura 12 D). Preparou-se um segundo lote (CAE), exactamente da mesma forma, sem incluir absorvente de O₂. No terceiro lote (CGE), as douradas foram

acondicionadas sobre gelo, em caixas perfuradas (Figura 11 B). Os três lotes foram conservados em refrigerado, conforme se ilustra na Figura 11.

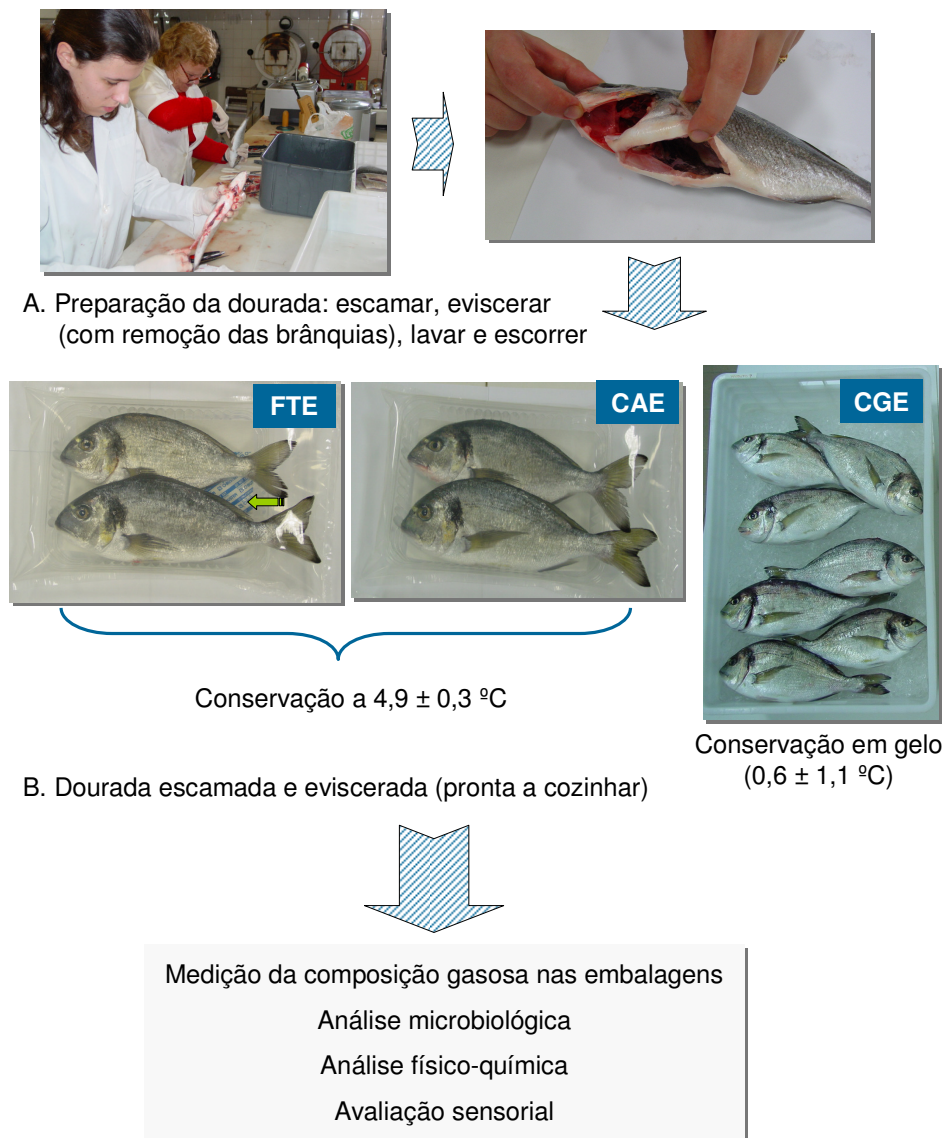


Figura 11. Preparação e acondicionamento de dourada no ensaio de conservação em embalagem activa (FTE), contendo absorvente de oxigénio FT300, assinalado com seta (B). CAE – embalagem em ar.

2.3.3. Pré-tratamento SGS combinado com embalagem sob vácuo

As douradas e os robalos foram filetados (Figura 12 A e B) e os filetes (com pele) foram lavados, escorridos e acondicionados em cuvetes, sobre absorventes de humidade, com a pele voltada para baixo. Em cada cuvette colocaram-se quatro filetes, provenientes de peixes diferentes.

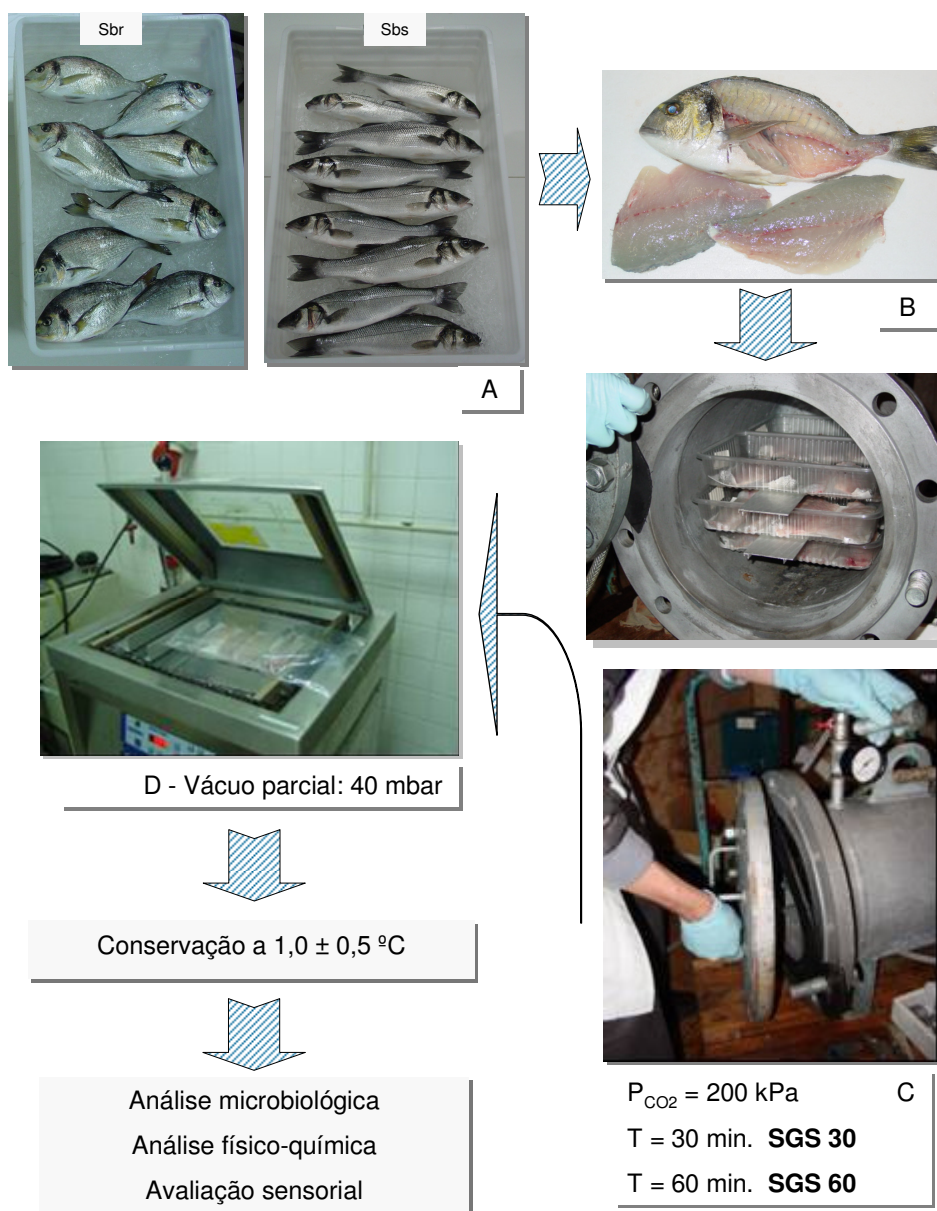


Figura 12. Etapas do processo de pré-tratamento SGS com CO_2 de filetes de dourada e de robalo.

A – Dourada (Sbr) e robalo (Sbs) provenientes de aquacultura; B – filetagem; C - câmara de aço inox, contendo filetes para tratamento (dois tempos diferentes); D – aplicação de vácuo parcial, seguida da soldadura das embalagens, na máquina de embalar Multivac A 300/52.

Colocaram-se as cuvets na câmara de alta pressão (Figura 12 C), na qual se injectou 100 % de CO_2 durante alguns minutos, mantendo a válvula de saída aberta, de modo a eliminar todo o ar presente na câmara (confirmado através da medição da composição gasosa no interior da câmara). De seguida, fechou-se a válvula e manteve-se o fluxo de CO_2 à pressão de 2 bar (equivalente a 200 kPa), durante 30 minutos (lote SGS 30) e 60 minutos (lote SGS 60) (Figura 12 C). Este processo realizou-se numa câmara de refrigeração a $1 \text{ }^\circ\text{C}$. Imediatamente após o pré-tratamento, introduziram-se as cuvets com os filetes

nos sacos de embalar e procedeu-se à aplicação de vácuo parcial (40 mbar), seguida da soldadura das embalagens, na máquina de embalar Multivac (Figura 12 D). Preparou-se um controlo de forma semelhante com excepção do pré-tratamento. Todas as embalagens foram conservadas numa câmara refrigerada, à temperatura aproximada de 1 °C.

2.3.4. Conservação em atmosfera rica em oxigénio

Separaram-se as amêijoas vivas, depuradas, em dois lotes: um manteve-se na forma usual de acondicionamento – em sacos de rede, ao ar (controlo) - enquanto que no segundo lote, se introduziu o saco de rede no saco de embalar, procedendo-se de seguida à injeção da mistura gasosa binária (Figura 13) e selagem dos sacos, na máquina Multivac A 300/52 (embalagens MAP). O volume interno aproximado destas embalagens era de 1 261 cm³ (1 kg de amêijoa-boua viva por embalagem). Conservaram-se ambos os lotes numa câmara refrigerada, à temperatura aproximada de 6 °C, durante seis dias.

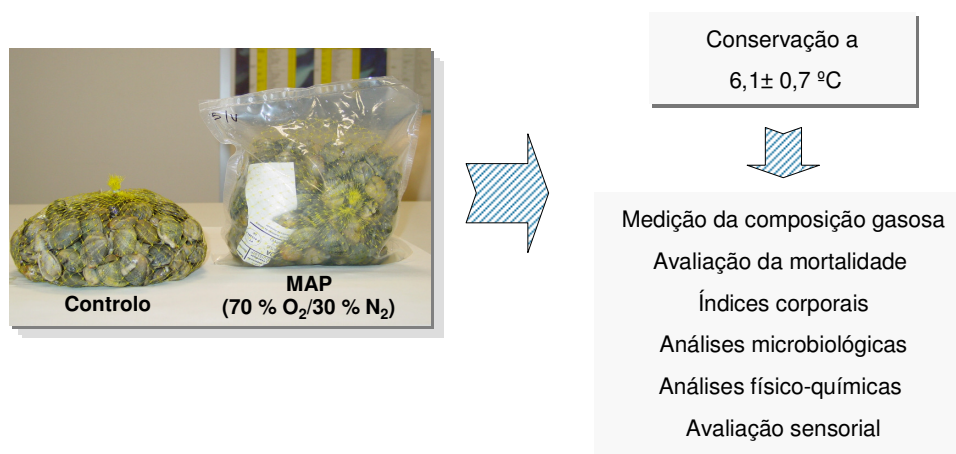


Figura 13. Esquema do ensaio de conservação de amêijoa-boua viva em atmosfera modificada.

2.4. Análises microbiológicas

Na realização das análises cumpriram-se as regras gerais descritas na norma ISO 7218 (ISO, 2007). Não se procedeu à realização de análises microbiológicas nos ensaios de conservação de linguado-do-Senegal.

2.4.1. Constituição e preparação da amostra

Prepararam-se todas as amostras em condições de assépsia. As suspensões mãe foram preparadas homogenizando pedaços de músculo (10 – 25 g), sem pele, com diluente triptona sal (Triptona a 0,1%, Merck 7213, contendo 0,85 % de cloreto de sódio, Merck 6404), numa proporção de 1:10 (m/m), num agitador “Stomacher” (Colwoth 400), durante 1 minuto. Prepararam-se diluições decimais (1 ml da suspensão mãe + 9 ml de diluente) para a enumeração de microrganismos viáveis totais.

No caso da amêijoia-boia, recolheram-se 40 indivíduos vivos de cada réplica e procedeu-se à lavagem das conchas com água corrente e à eliminação de toda a sujidade com uma escova. Deixou-se escorrer e secar sobre toalhas de papel absorvente. Procedeu-se à abertura das conchas e remoção de toda a parte muscular, órgãos e líquido intervalvar para sacos estéreis. Homogeneizou-se no agitador “Stomacher” durante 2 a 3 minutos. Retirou-se uma toma de 25 g e adicionou-se 100 ml de triptona sal na proporção de 1:10 (m/m). Prepararam-se diluições decimais para a enumeração de microrganismos viáveis totais e enumeração de *Pseudomonas spp.* Recolheu-se uma segunda toma de 40 g e adicionou-se 100 ml de diluente triptona sal, voltando-se a homogeneizar durante 2 minutos. Adicionou-se o restante diluente (360 ml) de modo a obter a proporção 1:10 (m/v) e homogeneizou-se vigorosamente. Procedeu-se à preparação de diluições decimais para a quantificação de *Escherichia coli*. A terceira toma, de 25 g, destinou-se a preparar o pré-enriquecimento, para a pesquisa de *Salmonella spp.*

Todas as diluições decimais bem como as inoculações foram preparadas e realizadas numa câmara de segurança biológica vertical, de fluxo laminar Biohazard Braun 2.4 micro (MDH Ltd., Walworth, Reino Unido). De um modo geral, as sementeiras foram realizadas em duplicado.

2.4.2. Preparação do diluente e dos meios de cultura

O diluente e todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as indicações dos fabricantes (Oxoid, 2009) e foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

2.4.3. Enumeração de microrganismos viáveis totais (TVC)

Semeou-se, por espalhamento, 1 ml de inóculo das diluições adequadas, dos grupos IT2 e SI3 de dourada conservada em gelo, em placas de Petri, contendo aproximadamente 15 ml de meio de cultura Plate Count Agar (PCA, Merck 5463). Após arrefecimento, incubaram-se as placas em aerobiose, numa estufa à temperatura de 20 ± 2 °C, durante 5 a 6 dias.

No caso da dourada conservada em embalagem activa, dos filetes pré-tratados em SGS e da amêijoia-boia, semeou-se 1 ml de inóculo, por incorporação em meio PCA (aproximadamente 15 ml). Misturou-se cuidadosamente o inóculo com o meio e deixou-se solidificar à temperatura ambiente. Após arrefecimento, incubaram-se as placas numa estufa à temperatura de 30 ± 2 °C, durante 72 horas, em aerobiose e em jarra de anaerobiose (sistema AnaeroGenTM – Oxoid), no caso da dourada conservada em embalagem activa. No caso dos filetes pré-tratados em SGS, realizou-se a incubação apenas em jarra de anaerobiose. Determinou-se o número de microrganismos por contagem directa das colónias. Os resultados foram expressos em log cfu/g.

2.4.4. Enumeração de *Pseudomonas spp.* (PSE)

Semeou-se, por espalhamento, 1 ml de inóculo das diluições adequadas, em placas de Petri, contendo aproximadamente 15 ml de meio de cultura *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid CM0559) suplementado com CFC (Oxoid SR0103), recomendado para o isolamento da generalidade das espécies de *Pseudomonas* em produtos refrigerados. Incubaram-se as placas em aerobiose a 37 ± 1 °C, durante 24

a 48 horas. Determinou-se o número de microrganismos por contagem directa das colónias. Os resultados foram expressos em log cfu/g.

2.4.5. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Procedeu-se à pesquisa de *Salmonella* spp. apenas nas amostras de amêijoia-boia, no dia de recepção no laboratório (início), utilizando um teste rápido (Oxoid FT0201), validado por Association Française de Normalisation (AFNOR, 2009) em comparação com o método de referência, descrito na norma ISO 6579 (ISO, 2002). Este teste era composto por diversos recipientes de cultura, cada um contendo dois tubos de cultura. O tubo A continha meio Rappaport modificado (meio selectivo) e meio indicador, composto por lisina, ferro e cistina. O tubo B continha agar de xilose lisina desoxicolato, como meio selectivo e agar de verde de brilhante modificado, como meio indicador. O teste continha ainda discos de antibiótico (1,8 mg de novobiocina) (FT0207), duas seringas, diversas agulhas e uma chave para abertura dos tubos (Oxoid, 2009).

Iniciou-se o método com o pré-enriquecimento da amostra (25 g) em 225 ml de água peptonada tamponada (APT, Oxoid CM0509), por incubação a 37 ± 1 °C, durante 18 - 24 horas. Agitou-se o pré-enriquecimento e deixou-se repousar até as partículas em suspensão assentarem. Inoculou-se 1 ml no recipiente de cultura do teste rápido, previamente preparado, de acordo com as instruções do fabricante (Oxoid, 2009), usando o meio de eleição (SRTEM, Oxoid CM0857) e o antibiótico. Incubou-se numa estufa regulada a 41 ± 1 °C durante 24 horas, mantendo o recipiente na posição vertical. Examinaram-se, com boa luz, as secções superiores de ambos os tubos, para pesquisa de alteração da cor (através da parede do recipiente). Um resultado positivo - presença presuntiva de *Salmonella* - é evidenciado pela alteração de cor do meio indicador superior em qualquer dos dois tubos: qualquer nível de coloração negra no tubo A e qualquer nível de coloração negra e/ou vermelha no tubo B. Nestes casos procede-se à confirmação dos tubos suspeitos através do isolamento em dois meios sólidos selectivos (agar xilose lisina desoxicolato (XLD, Oxoid CM0469) e Brilliant Green Agar modified (BGA, Oxoid CM0329) e incubação a 37 ± 1 °C durante 24 horas, seguida da identificação das colónias suspeitas (colónias vermelhas, com ou sem centro negro e colónias vermelhas, no caso dos meio XLD e BGA, respectivamente) por testes bioquímicos e serológicos apropriados. Os resultados foram expressos em presença/ausência em 25 g de amostra.

2.4.6. Quantificação de *Escherichia coli*

Procedeu-se à quantificação de *E. Coli* apenas nas amostras de amêijoia-boia, utilizando o método do número mais provável (MPN), seguido de confirmação em agar cromogénico, de acordo com o método descrito por Donovan *et al.* (1998) e ISO/TS 16649-3 (ISO, 2005). Prepararam-se três séries de 5 tubos: na primeira semeou-se 10 ml da suspensão-mãe (10^{-1}), preparada conforme descrito no ponto 2.3.3.1, em cada tubo, contendo caldo de glutamato modificado, com minerais (MMGB, Oxoid CM0607) de concentração dupla; na segunda série, semeou-se 1 ml da suspensão-mãe em cada tubo, contendo MMGB de concentração simples e na terceira 1 ml da diluição 10^{-2} nos tubos com MMGB de concentração simples. Incubaram-se os tubos semeados a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Consideraram-se suspeitos os tubos que apresentaram produção de ácido (viragem da cor lilás do meio para amarelo), procedendo-se à

confirmação por repicagem dos tubos suspeitos, utilizando ansas de 10 µl, para placas contendo agar de triptona com sais biliares e X-β-glucuronídeo (TBX, Oxoid CM0945). Incubaram-se os tubos a 44 ± 1 °C durante 24 horas, considerando-se o crescimento de colónias azuis/esverdeadas indicador da presença de *E. coli*. Registaram-se o número de tubos apresentando reacção positiva (em cada série) e usou-se a tabela MNP (ISO, 2005) para o cálculo do número mais provável de organismos em 10 g de amostra.

2.5. Determinações físicas

2.5.1. Medição de gases

Mediu-se a composição gasosa no interior das embalagens de dourada escamada/eviscerada e de amêijoa-boia com um analisador de gases da marca ABISS (ABISS, Chatillon, França), modelo AbissPrint. Este equipamento mede a percentagem de O₂, através da detecção electroquímica (precisão de 1 %) e de CO₂, por sistema de infravermelhos (precisão de 2 %), sendo o teor de N₂ obtido por diferença. A composição gasosa foi sempre determinada antes da abertura das embalagens recolhidas para análise.

2.5.2. Medição do valor de pH

Determinou-se o valor de pH por potenciometria, utilizando um medidor de pH Metrohm 744, equipado com um eléctrodo de semi-sólidos. No caso das amostras de peixe (linguado, dourada inteira, escamada/eviscerada e filetes pré-tratados em SGS), efectuou-se a medição numa polpa homogénea obtida por trituração de músculo sem pele, numa picadora Moulinex. No caso da amêijoa-boia, recolheu-se a parte edível e o líquido intravalvar de 15 amêijoas (vivas) de cada replicado e homogeneizou-se num homogeneizador Polytron, procedendo-se de seguida à medição do valor de pH. Realizaram-se três medições para cada amostra.

2.6. Análises químicas

O grau de pureza dos reagentes utilizados nas análises químicas eram adequados aos diferentes tipos de determinação, mas em geral, eram de grau analítico ou equivalente, das marcas Sigma e Merck. A água utilizada nas determinações e na preparação de soluções aquosas foi produzida num aparelho Millipore modelo Milli-Q Plus. Os padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração eram das marcas Sigma e Merck. Todas as soluções padrão, bem como os extractos das amostras a usar em análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram previamente filtradas por membrana de 0,2 ou 0,45 µm de porosidade.

2.6.1. Constituição e preparação da amostra

As análises químicas foram efectuadas em polpas homogéneas da parte muscular do peixe, isenta de pele. Utilizou-se uma picadora Moulinex para a homogeneização do material. De um modo geral, congelaram-se as amostras a -80 °C até à realização das determinações analíticas.

No caso da amêijoa-boia, constituíram-se as amostras de cada embalagem, a partir de 40 a 50 animais vivos que foram imediatamente colocados numa arca a -80 °C, de forma a causar a sua morte.

Dias depois (três a quatro) deixou-se semi-descongelar as amostras, procedendo-se de imediato à remoção da parte edível (todos os tecidos moles) dos indivíduos, voltando-se a congelar a -80 °C. Procedeu-se à liofilização das amostras durante 48 horas. As amostras secas foram finamente trituradas, numa picadora Moulinex. Realizaram-se todas as determinações químicas nas amostras liofilizadas. As tomas de amostra para as diferentes determinações foram pesadas numa balança com resolução de 0,1 mg.

2.6.2. Composição química aproximada

Determinaram-se os teores de humidade, cinza, proteína bruta, gordura livre e gordura total de acordo com os métodos de referência descritos em AOAC (1998). No caso de amostras liofilizadas, o teor de humidade foi também determinado na amostra húmida para determinação da razão peso húmido/peso seco, para uma correcta conversão dos valores em base húmida. Considerou-se peso constante sempre que duas pesagens sucessivas, no final do processo de secagem (ou incineração, no caso da cinza) e arrefecimento em excicador, não diferiam entre si mais do que 1 ou 10 mg, no caso da cinza e humidade, respectivamente, ou 0,1 % da massa da toma, no caso da determinação da gordura.

A **humidade** foi determinada por gravimetria em 5 – 10 g de amostra, após 12 - 16 horas de secagem da amostra em estufa a 105 ± 2 °C até obtenção de peso constante (Método AOAC 950.46).

O **teor de cinza** foi determinado por gravimetria após incineração da amostra (1 – 3 g), previamente seca em estufa regulada a 105 ± 2 °C, durante 12-16 horas, em mufla a 500 ± 25 °C, até obtenção de peso constante (Método AOAC 942.05).

A **proteína bruta** determinou-se em 0,5 – 0,6 g de amostra, através do doseamento de azoto total por destilação, em aparelho de Kjeldahl, após 70 minutos de digestão da amostra em meio ácido à temperatura de 410 °C (Método AOAC 981.10). Obteve-se o teor de proteína por multiplicação do teor em azoto total pelo factor 6,25, de acordo com a equação seguinte.

$$\text{Proteína (g/100 g)} = V_{\text{HCl}} \times N \times \text{Eq} \times 100 \times 6,25 / m$$

em que: V_{HCl} – volume de ácido gasto na titulação da amostra (ml); N – normalidade de HCl usado = 0,1 N; Eq – equivalente grama do azoto = 14,007 g; m – massa de amostra digerida (g).

A **gordura livre** foi extraída em amostras húmidas (5 - 10 g) com éter etílico, num aparelho de Soxhlet (Método AOAC 991.36), durante 7 horas à temperatura aproximada de 40 °C. Após evaporação do solvente, secou-se o resíduo de gordura, até obtenção de peso constante, numa estufa a 105 ± 2 °C.

A **gordura total** foi extraída em amostras liofilizadas de amêijoia-bona, após hidrólise ácida, de acordo com os métodos AOAC (948.15 e 922.06). Pesou-se cerca de 2 g de amostra e adicionou-se 2 ml de etanol, agitando bem a mistura. Juntou-se cerca de 10 ml de HCl 36 %, misturou-se bem e deixou-se hidrolisar durante 90 minutos, a 70 – 80 °C. Deixou-se arrefecer um pouco e adicionou-se 10 ml de etanol. Após arrefecimento, transferiu-se a mistura para uma ampola de decantação de 100 ml. Lavou-se o resíduo do recipiente de hidrólise com 25 ml de éter etílico, adicionado por 3 vezes, transferindo-se as soluções de lavagem para a ampola. Agitou-se vigorosamente a ampola durante 1 minuto. Repetiu-se o

processo com 25 ml de éter de petróleo e deixou-se repousar até a fase orgânica ficar totalmente límpida. Recolheu-se a fase orgânica através de um funil de vidro, contendo um filtro de algodão, firmemente justaposto, para um balão redondo de 250 ml, previamente seco em estufa a 100 ± 2 °C e pesado. Lavou-se a ampola de decantação por duas vezes, com 15 ml de cada éter, agitando a ampola de cada vez. Lavou-se bem o algodão e a ponta do funil, com um pequeno volume de uma mistura composta por idênticos volumes dos dois éteres. Evaporou-se os solventes orgânicos num aparelho de soxhlet, à temperatura aproximada de 40 °C. Secou-se o resíduo de gordura no balão em estufa a 100 ± 2 °C durante uma hora. Levou-se a peso constante.

O teor de **glicogénio** foi determinado apenas nas amostras de amêijoia-boia, de acordo com o método descrito por Viles e Silverman (1949). Hidrolisou-se a amostra liofilizada (25 mg) com 15 ml hidróxido de potássio a 33% durante 15 minutos. Após arrefecimento, recolheu-se 0,250 ml e diluiu-se com 0,250 ml de água. Adicionou-se 50 µl de uma solução saturada de sulfato de sódio anidro e 2 ml de etanol e colocou-se em banho de gelo, durante 30 minutos, para precipitação do glicogénio. Após centrifugação (8 minutos a 9000 rpm), dissolveu-se o precipitado em 0,5 ml de água, adicionando-se 1 ml de etanol. Deixou-se precipitar novamente durante 30 minutos e voltou-se a centrifugar, nas mesmas condições. Fez-se reagir o glicogénio precipitado em 0,5 ml de água destilada e 3 ml de reagente de antrona, em banho de água a 90°C, durante 20 minutos. Mediu-se a absorvância do complexo glicogénio-antrona a 620 nm num espectrofotómetro marca Unicam. Preparou-se uma curva de calibração usando glicogénio como padrão. O reagente de antrona foi preparado em 45 ml de água à qual se adicionou 114 ml de ácido sulfúrico concentrado e 0,225 g de antrona.

Os teores dos diversos constituintes foram expressos em g/100 g de músculo ou parte edível, em base húmida.

2.6.3. Compostos azotados voláteis

Determinou-se a concentração de TVB-N, TMA-N e TMAO-N de acordo com o método de microdifusão modificado, descrito por Cobb *et al.* (1973). Homogeneizou-se a parte muscular do peixe (10 – 25 g), previamente triturada numa picadora Moulinex, com uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10 %, numa proporção de 1:2 (m/v), num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG), durante 1 minuto. Filtrou-se o extracto por papel de filtro Whatman 2V. O filtrado foi armazenado a -80 °C até à determinação analítica. Para o doseamento do TMAO-N, utilizou-se 5 ml do extracto filtrado e adicionou-se 1,5 ml de uma solução de cloreto de titânio ($TiCl_3$) a 15 %, deixou-se em 10 minutos no escuro, de modo a reduzir todo o OTMA presente a TMA. Colocou-se 1 ml deste extracto em células do tipo Conway descartáveis, juntamente com 1 ml de água destilada, 1 ml de uma solução saturada de carbonato de potássio e 1 ml de uma solução de formaldeído a 37 %, para fixar as aminas primárias e secundárias, permitindo a libertação apenas da trimetilamina. Para o TVB-N e TMA-N utilizou-se 1 ml do extracto inicial, juntamente com 1 ml de água destilada e 1 ml de uma solução saturada de carbonato de potássio e ainda 1 ml de formaldeído a 37 %, no caso do TMA-N. Para a coroa central das células de Conway, mediu-se 1 ml de uma solução de ácido bórico a 1 %, contendo 0,033 % de verde de bromocresol e 0,066 % de vermelho de metilo, como indicadores. As células, cobertas por uma tampa de vidro, foram incubadas em estufa a 37 °C, durante 2 horas. Deixou-se arrefecer e titulou-se o azoto fixado, pelo ácido bórico, com ácido clorídrico (HCl) 0,02 N e 0,005 N, respectivamente no caso do TVB-N e TMA-N, até ao aparecimento

da cor rosa. Em paralelo efectuou-se um ensaio em branco com água destilada e um ensaio padrão, com sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄) a 0,1 %, para determinação do coeficiente de difusão do azoto. Para o cálculo da concentração de TMAO-N subtraiu-se a concentração de TMA-N presente na amostra à concentração de TMA-N total, proveniente da redução do OTMA. Os resultados dos vários compostos foram expressos em mg N/100 g de músculo, de acordo com as equações seguintes:

$$\text{TVB-N/TMA-N (mg/100g)} = \frac{V_a \times (m \times H + V)}{m \times V_e} \times \frac{C_s \times V_s \times 28 \times 10^3}{V_D \times PM_s}$$

$$\text{TMAO-N (mg/100g)} = \frac{V_a \times V_t \times (m \times H + V)}{m \times V_e \times V'_e} \times \frac{C_s \times V_s \times 28 \times 10^3}{V_D \times PM_s} - \text{TMA-N}$$

em que: V_a – volume HCl gasto na titulação da amostra, após subtração do branco (ml); m – massa de amostra; H – teor de humidade da amostra (%); V – volume TCA usado na preparação do extracto (ml); V_D – volume HCl gasto na titulação do ensaio difusão, após subtração do branco (ml); C_s – Concentração de (NH₄)₂SO₄ usado no ensaio difusão; V_s – volume de solução (NH₄)₂SO₄ (ml); PM_s – Massa molecular de (NH₄)₂SO₄ (g/mol); V_e – volume de extracto usado (ml); V'_e – volume de extracto usado para reagir com TiCl₃ (ml); V_t - volume total de extracto após adição de TiCl₃ (ml); 28 - peso molecular do azoto (g/mol).

2.6.4. Nucleótidos e catabolitos

Homogeneizou-se 5 g de músculo de peixe com 25 ml de uma solução aquosa de ácido perclórico 0,6 M a 0 °C, durante 1 minuto, num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG). Centrifugou-se a 3000 g, numa centrifuga marca Sigma modelo 3K 30, durante 10 minutos, à temperatura de 0 °C e em seguida neutralizaram-se 10 ml de sobrenadante, a pH 6,5 – 6,8, com uma solução de hidróxido de potássio 1 M. Deixou-se repousar durante 30 minutos a 0 °C e eliminou-se o perclorato de potássio por filtração. Diluiu-se o filtrado a 20 ml com água ultra pura e filtrou-se um pequeno volume por membrana filtrante de 0,25 µm de porosidade. O filtrado foi armazenado a -80 °C até à determinação analítica. A separação dos diversos compostos efectuou-se por HPLC, de acordo com o método descrito por Ryder (1985), em cromatógrafos equipados com colunas de fase reversa Lichrosorb RP-18 10 µm, 200 - 250 x 4,6 mm com eluição isocrática (fluxo = 1,7 ml/min) e detecção a 254 nm, num detector de díodos. A fase móvel era composta por uma solução de tampão fosfato 0,1 M [hidrogenofosfato de potássio (10,45 g/l) + dihidrogenofosfato de potássio (5,45 g/l), pH = 6,95], previamente filtrada, por membrana de 0,25 µm de porosidade, num sistema de filtração Millisolve XF 1604700. A identificação e quantificação dos compostos (ATP, ADP, AMP, IMP, Ino e Hx) realizou-se por comparação com curvas de calibração, através de um sistema de aquisição e tratamento de dados HPLC Chemstation Ver. A.02.02. As curvas de calibração foram elaboradas com soluções padrão (aquosas) filtradas por membrana de 0,25 µm de porosidade, numa gama de concentrações de 0,04 - 1,66 µmol/ml. Os resultados foram expressos em µmol/g de músculo. Calculou-se a taxa de degradação nucleotídica através do índice K_i.

2.6.5. Aminas biogénicas

Estes compostos foram quantificados nos extractos utilizados na determinação dos compostos azotados voláteis (ponto 2.6.3), depois de filtrados por filtro de 0,45 µm de porosidade. O extracto filtrado foi armazenado a -80 °C até à determinação analítica. A separação das aminas realizou-se por HPLC, numa coluna de fase reversa, Spheri-5 RP18 5µm, 220 x 4,6 mm, segundo um gradiente de eluição da fase móvel, constituída por dois eluentes: tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial, contendo ácido 1-octanosulfónico) e tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial, contendo acetonitrilo e ácido 1-octanosulfónico) (fluxo = 1ml/min), derivatização pós-coluna, com reagente de ortoftaldeído (OPA) e detecção dos compostos por fluorescência, num fluorímetro Perkin-Elmer LS-1 ($\lambda_{\text{Excitação}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Emissão}} = 455 \text{ nm}$), de acordo com o método descrito por Veciana-Nogues *et al.* (1995). Preparou-se o reagente de OPA adicionando 10 ml de solução metanólica de OPA (a 10 %), 3 ml de Brij 35 (a 30 %, p/v) e 3 ml de mercaptoetanol a uma solução de ácido bórico 1 M (pH 10,0 ajustado com hidróxido de potássio, em lentilhas). A solução obtida foi ajustada a 1000 ml com a solução de ácido bórico, à temperatura ambiente. Todas as soluções foram filtradas por membrana 0,2 µm de porosidade e desarejadas antes da sua utilização. A quantificação dos compostos realizou-se por comparação com curvas de calibração, na gama de trabalho de 1,25 – 10 µg/ml, através de um sistema de aquisição e tratamento de dados Ezchrom™ Chromatography Data System, vers. 6,7; Scientific Software Inc. O método permitiu identificar e quantificar a HIM, CAD, PUT, TYR e AGM. Os resultados foram expressos em g/kg de músculo.

2.6.6. Aminoácidos livres

Efectuou-se a extracção dos aminoácidos livres de acordo com o método descrito por Gras *et al.* (1978). Homogeneizou-se 5 g de músculo com 50 ml de uma solução de TCA a 10 %, durante 1 minuto a 0 °C, num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG). Centrifugou-se a 20 000 g, numa centrifuga marca Sigma modelo 3K 30, durante 10 minutos, a 0 °C. Recolheu-se 10 ml de sobrenadante e liofilizou-se. Dissolveu-se o resíduo seco em tampão citrato de sódio (0,2 M; pH 2,20) e filtrou-se por membrana de 0,2 µm de porosidade. Armazenou-se o filtrado a -80 °C até à determinação analítica. A separação dos aminoácidos efectuou-se por cromatografia de troca iónica, num analisador automático de aminoácidos Biochrom 20 (Amersham Pharmacia Biotech AB), equipado com coluna PEEK de sódio, 200 x 4,6 mm, segundo um gradiente de tampões de citrato de sódio (Amersham Biosciences, fluxo: 0,6 ml/min) e temperaturas: 50 °C, 7 min, tampão 0,20 M, pH 3,20; 58 °C, 17 min, tampão 0,20 M, pH 4,25 e 95 °C, 20 min, tampão 1,20 M, pH 6,45. Os aminoácidos separados reagiram com reagente de ninidrina (Amersham Biosciences, fluxo: 0,4 ml/min) a 130 °C e os compostos formados foram detectados a 440 e 570 nm. A identificação e quantificação dos aminoácidos realizou-se por comparação com curvas de calibração, através de um sistema de aquisição e tratamento de dados Ezchrom™ Chromatography Data System, vers. 6,7; Scientific Software Inc. Para a elaboração das curvas de calibração prepararam-se soluções padrão aquosas a partir de uma solução padrão, contendo os 18 aminoácidos mais comuns (SIGMA AA-S-18), numa gama de concentrações de 0,13 - 1,02 µmol/ml. Os resultados foram expressos em g/100 g de músculo.

2.6.7. Índice de peróxido (POV)

Determinou-se a formação de peróxidos (compostos primários resultantes da oxidação lipídica) de acordo com o método titrimétrico AOAC 965.33 (AOAC, 1998), utilizando o óleo extraído do músculo de peixe, segundo o método descrito por Bligh e Dyer (1959). A 1 g de óleo de peixe adicionou-se 10 ml de clorofórmio, 15 ml de ácido acético glacial e 1 ml de uma solução saturada de iodeto de potássio. Agitou-se a mistura e deixou-se repousar, ao abrigo da luz, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Adicionou-se 75 ml de água e umas gotas de uma solução de cozimento de amido a 1 % (m/v), como indicador. Agitou-se bem a mistura e titulou-se com uma solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N até viragem da cor roxa para amarelo palha. Em paralelo, realizou-se um ensaio em branco. Os resultados foram expressos em meq O_2 activo/kg óleo, de acordo com a equação seguinte:

$$\text{POV (meq O}_2\text{/kg óleo)} = \frac{N \times (V_1 - V_2) \times 10^3}{m}$$

em que: N - normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (eq/1 L); V_1 e V_2 – volumes da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ usados na titulação da amostra e do ensaio em branco, respectivamente (ml); m – massa de óleo usada no ensaio (g).

2.6.8. Determinação de aldeído malónico por colorimetria - TBARS

O nível de oxidação lipídica foi também avaliado através da formação de compostos oxidados secundários, como o aldeído malónico, após reacção com o TBA, por colorimetria, de acordo com o método descrito por (Vyncke, 1970). Preparou-se um extracto com músculo de pescado (10 - 15 g), previamente triturado e uma solução TCA 7,5 % (m/v), contendo 0,1 % de solução alcoólica de galato de propilo (5 %, m/v) e 0,1 % de ácido etilenodiaminotetracético, numa proporção de 1:2 (m/v), homogeneizando em Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG), durante 2 minutos e filtrou-se por filtro Whatman nº 1. Recolheu-se, para tubo rolhado, um volume do extracto filtrado, entre 1 a 5 ml (de acordo com o valor esperado), perpez-se a 5 ml com a solução de TCA 7,5 %, adicionou-se 5 ml de TBA 0,02 M e colocou-se em banho de água fervente, durante 40 minutos. Após arrefecimento, mediu-se a absorvância da solução corada a 530 nm num espectrofotómetro Unicam. Simultaneamente realizou-se um ensaio em branco, com substituição do extracto por 5 ml da solução de TCA 7,5 %. Preparou-se a curva de calibração a partir de uma solução padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), de concentração 10^{-8} mol/ml, diluindo volumes adequados com a solução de TCA 7,5%, de modo a obter uma gama de concentrações de 0,01 – 0,05 $\mu\text{mol/ml}$, seguindo o mesmo processo de reacção com o TBA (para libertação do MDA), descrito para as amostras. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de gordura, de acordo com a equação:

$$\text{TBARS}(\mu\text{mol/g gordura}) = \frac{C \times (V_1 + m \times H)}{m \times G \times V_2} \times 10^3$$

em que: C – concentração de TBARS, calculado a partir da curva de calibração ($\mu\text{mol/ml}$); V_1 – volume de TCA utilizado na preparação do extracto (ml); m – massa de amostra usada na preparação do extracto (g);

H – teor de humidade da amostra (%); V_2 – toma de amostra para reacção com TBA (ml); G – teor de gordura em 100 g de amostra.

2.6.9. Determinação de aldeído malónico por HPLC

No caso da amêijoia-boia, determinou-se a formação de MDA segundo o procedimento descrito por Cordis *et al.* (1998). Preparou-se um extracto a partir de 1 g de material liofilizado com 10 ml de uma solução TCA 7,5 % (m/v), contendo 0,1 % de solução alcoólica de galato de propilo (5 %, m/v) e 0,1 % de ácido etilenodiaminotetracético, por homogenização em Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG), durante 2 minutos. Filtrou-se por filtro Whatman nº 1 e recolheu-se 1 ml do filtrado ao qual se adicionou 100 µl de uma solução ácida (pH 0,1) de 2,4 - dinitrofenilhidrazina (DNPH) (5 mM DNPH em solução aquosa 2M de HCl). A esta mistura adicionou-se 4 ml de hexano e agitou-se vigorosamente, num agitador vortex, durante 5 minutos e deixou-se repousar durante uma hora no escuro. Removeu-se a fase orgânica, contendo o MDA, com uma pipeta Pasteur, para tubo adequado. Voltou-se a adicionar 4 ml de hexano, agitou-se vigorosamente e recolheu-se a de imediato a fase orgânica, juntando-se as duas recolhas. Evaporou-se o hexano aplicando uma corrente de azoto, à temperatura ambiente (20 - 25 °C), num equipamento Reacti-Therm III (Pierce, Thermo Scientific), com sistema de evaporação acoplado. Dissolveu-se o resíduo seco em 50 µl de acetonitrilo e injectou-se num HPLC Agilente 1100 Series, equipado com um detector de díodos. A separação do aducto MDA-DNPH realizou-se numa coluna Phenomenex Gemini C18 (5 µm, 250x 4,6 mm), com eluição isocrática (1 ml/min) da fase móvel, constituída por uma solução contendo água, acetonitrilo e ácido acético, numa proporção de 50:50:0,1 (v/v), respectivamente. A detecção do composto realizou-se a 310 nm e quantificou-se recorrendo a curvas de calibração, utilizando TEP (não sujeito a hidrólise) como padrão de MDA, numa gama de concentração de 0,6 – 10,0 µM. Os resultados foram expressos em µmol/g de músculo.

2.7. Avaliação sensorial

Todas as sessões de avaliação sensorial foram realizadas numa sala específica, com a área de preparação das amostras fisicamente separada da área de avaliação, equipada com ar condicionado e gabinetes de prova individuais, equipados com uma lâmpada fluorescente, de luz branca, água e uma piletta (Figura 14 A, B e F). Apresentaram-se as amostras sempre codificadas.

Utilizou-se um painel constituído por oito elementos do Ipimar, de ambos os sexos, não fumadores, com idades compreendidas entre os 34 e os 60 anos, com experiência em avaliação sensorial de pescado fresco.

Sempre que necessário, realizaram-se sessões em que o painel avaliou amostras em conjunto, numa mesa branca, como no caso do linguado e da amêijoia-boia, para selecção dos atributos e descritores bem como para treino do painel sensorial, no caso da amêijoia-boia. Não foi adicionado qualquer condimento ou tempero às amostras para avaliação em cozido.

Estabeleceram-se limites de aceitabilidade sensorial, com base na pontuação/classificação dos produtos crus e/ou cozidos, para definição do período de conservação útil.

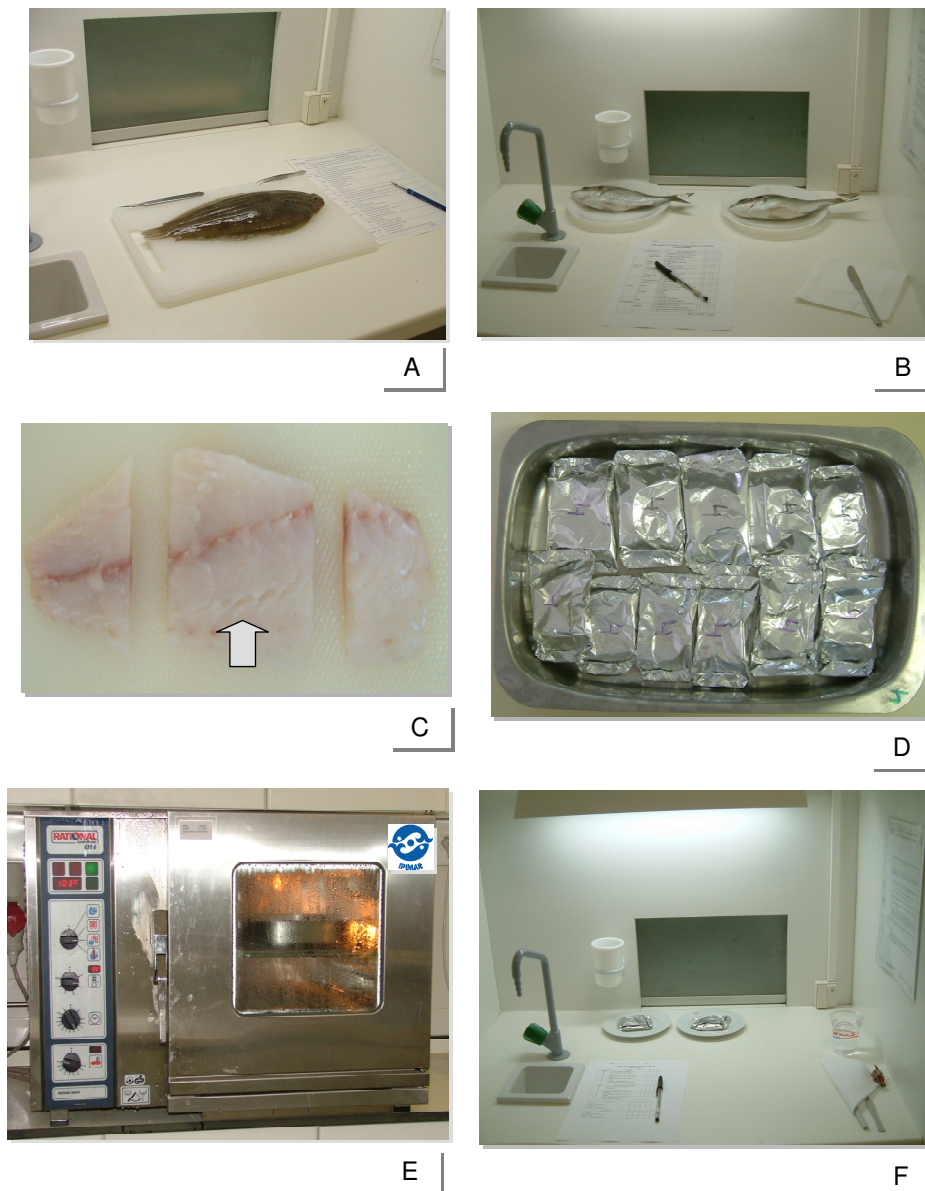


Figura 14. Preparação das amostras para avaliação sensorial. A e B – Avaliação da frescura de linguado e dourada; C – preparação de filetes para cozedura, utilizou-se apenas a parte central, assinalada pela seta; D – filetes envoltos individualmente em papel de alumínio, colocados em tabuleiro de inox, E – cozedura em forno a vapor Rational (Combi-Master CM6), F – gabinete de prova preparado para avaliação de filetes cozidos.

2.7.1. Avaliação da frescura em cru

Na avaliação da frescura de linguado e de dourada (inteira e escamada/eviscerada) apresentou-se o peixe cru, em tábuas de cozinha brancas ou em pratos brancos (Figura 14 A e B) e aplicaram-se os esquemas QIM, apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Em cada dia de amostragem avaliaram-se três a cinco peixes por cada lote/tratamento. Cada peixe foi avaliado por um provador. No caso da dourada eviscerada, foram avaliados dois peixes por tratamento, recorrendo-se a cinco provadores.

Parâmetros		Descritores/Pontos de demérito			
		0	1	2	3
Aspecto da pele	Lado ocelado	Pigmentação castanha brilhante	Ligeiramente baço ou descorado, pele ligeiramente enrugada	Baço, descorado, coloração esverdeada ou púrpura	Baço, coloração verde ou púrpura, pele muito enrugada
	Lado cego	Branco brilhante	Coloração ligeiramente púrpura nas extremidades das barbatanas	Baço, coloração púrpura, amarela nas barbatanas e na parte central	Coloração amarela e púrpura
	Muco	Claro, não coagulado	Ligeiramente coagulado e leitoso	Coagulado e ligeiramente amarelo	Amarelo e coagulado
Textura (lado ocelado)		Firme e elástica	Menos firme e elástica	Mole	Muito mole
Olhos	Forma	Plana, órbita convexa	Ligeiramente afundado, órbita enrugada	Olho afundado e/ou expandido, órbita enrugada	-----
	Cor/brilho	Córnea clara, pupila preta, bordo dourado em torno da pupila	Pupila bastante mate, bordo dourado esbatido em torno da pupila	Pupila mate, córnea púrpura ou avermelhada	-----
Brânquias	Cheiro	Fresco, a algas	Neutro, metálico, a borracha	A mofo, azedo	Podre, azedo, sulfuroso
	Cor	Brilhante, vermelha clara	Ligeiramente descorada	Descorada	Amarelada, coloração verde/azulada
	Muco	Ausente	Claro	Leitoso, ligeiramente coagulado	Amarelo, espesso, coagulado
Aspecto do filete	Cor	Clara, translúcida, azulada	Ligeiramente amarelada	Amarela, escurecida	Coloração cerosa, opaca, amarela ou castanha, escurecida
Índice de Qualidade: 0 – 28 pontos de demérito					

Figura 15. Esquema sensorial QIM (Método do Índice de Qualidade) inicial usado na avaliação do grau de frescura de linguado-do-Senegal.

A textura do músculo (firmeza e elasticidade) foi avaliada exercendo ligeira pressão com um dedo (usualmente o indicador ou o polegar) na região dorsal do peixe. A capacidade de recuperação do músculo e a rapidez com que acontece permite a seguinte classificação: firme e elástico – recuperação total do músculo, não ficando a marca da pressão; menos firme e elástico – recuperação mais lenta do músculo, não ficando marca; mole/plástico – músculo não recupera, ficando a marca da pressão.

Parâmetros		Descritores/Pontos de demérito			
		0	1	2	3
Aspecto da pele		Brilhante e iridescente	Menos brilhante e iridescente	Ligeiramente descorada	Muito descorada, baça
Textura		Muito firme e elástica	Firme e elástica	Mole, plástica	-----
Olhos	Aspecto da córnea	Límpida, translúcida	Ligeiramente turva	Turva e/ou amarelada	-----
	Pupila	Negra brilhante	Acinzentada, ligeiramente leitosa	Branca acinzentada	-----
	Forma	Convexa	Plana, ligeiramente côncava	Côncava, afundada	-----
Brânquias ^a	Cor	Vermelha brilhante	Vermelha menos brilhante	Vermelha descorada ou acastanhada	-----
	Cheiro	Fresco, neutro ou ligeiro a terra	Ligeiramente metálico	Mofo, azedo, ligeiro a peixe	Peixe, sulfídrico
Índice de Qualidade: 0 – 16 pontos de demérito					

^a Atributo excluído no caso da dourada escamada/eviscerada.

Figura 16. Esquema sensorial QIM (Método do índice de Qualidade) usado na avaliação da frescura de dourada inteira e escamada/eviscerada. Adaptado de Huidobro *et al.* (2000).

Relativamente aos filetes de dourada e robalo pré-tratados em SGS, avaliou-se o aspecto e o cheiro utilizando a escala categórica de cinco pontos (Meilgaard *et al.*, 1999), apresentada na Figura 17. Em cada dia de amostragem, foram avaliados quatro filetes provenientes de cada tratamento (controle, SGS 30 e SGS 60) utilizando um painel de quatro provadores (cada provador avaliou um filete de cada tratamento).

Parâmetros	Categorias				
	1	2	3	4	5
Cheiro	Azedo, pútrido, sulfídrico, amoniacal, ranço	Ligeiramente azedo, mofo, ligeiro a ranço	Ligeiro a peixe, metálico	Fresco	Muito fresco, ténue
Aspecto/Cor	Alterações evidentes. Cor amarelada, sobretudo na região ventral		Cor homogênea, de tonalidade creme. Ausência de translucidez		Cor característica: acinzentada na zona dorsal e rosa-nacarada na zona ventral. Filete translúcido

Figura 17. Escala usada na avaliação sensorial de filetes crus de dourada e robalo, pré-tratados em SGS com CO₂.

Na caracterização e avaliação da frescura de amêijoia-boia, durante a conservação em refrigerado, utilizou-se uma escala categórica de seis pontos (Figura 18), para classificar a intensidade do cheiro e do aspecto da parte edível (Meilgaard *et al.*, 1999: 52 – 54; 177).

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	Baça, opaca					Muito brilhante
	Cor creme-marfim, nacarada						
	Cor branca, leitosa						
	Cor amarelada, acastanhada						

Figura 18. Escala categórica usada na avaliação sensorial da frescura de amêijoia-boia (crua), durante a conservação a $6,1 \pm 0,7$ °C.

Para alguns atributos, associaram-se as categorias extremas a termos opostos, para maior clarificação do painel de provadores. Em cada dia de amostragem, avaliaram-se as réplicas (sacos de rede e embalagens MAP) de cada lote, independentemente, utilizando um painel de seis provadores. Consideraram-se inaceitáveis as réplicas cuja classificação média do cheiro amoniacal e/ou sulfídrico fosse superior a 2 pontos. Estas réplicas não foram usadas para constituir amostra destinada à avaliação sensorial em cozido.

2.7.2. Avaliação em cozido

Após a avaliação em cru, procedeu-se à evisceração, remoção da cabeça e à lavagem do peixe inteiro. No caso do linguado, cada exemplar foi envolto em papel de alumínio, previamente perfurado. A seguir foi cozido a vapor, à temperatura de 100 °C, durante 7 minutos, num forno a vapor (Rational Combi-Master CM6 Cross Kuchentechnik CmbH, Landsberg Lech, Germany) (Figura 14 E).

No caso da dourada, recolheu-se um dos filetes de cada exemplar avaliado em cru, aproveitando-se apenas a parte dorsal central de cada filete (Figura 14 C). Aplicou-se este procedimento também no caso dos filetes pré-tratados em SGS. Os filetes foram envolvidos individualmente em papel de alumínio

(Figura 14 D) e procedeu-se à cozedura no forno a vapor Rational, à temperatura de 100 °C, durante 8 a 10 minutos. As amostras foram apresentadas aos provadores em pratos brancos codificados (Figura 14 F).

Avaliou-se o cheiro e o sabor do linguado, dourada e dos filetes pré-tratados em SGS, usando a escala Torry (Howgate, 1982), ligeiramente adaptada a cada espécie em estudo (Figura 19).

Cheiro	Sabor	Pontos
Característico da espécie, muito fresco, ténue	Característico da espécie, adocicado	10
		9
		8
Perda de cheiro característico	Perda de sabor característico	7
Neutro	Insípido	6
Ligeiramente ácido, azedo ou a ranço	Ligeiramente amargo, acre ou a ranço	5
		4
Ácido, azedo, ranço, amoniacal ou a compostos sulfídricos (forte)	Muito amargo ou amoniacal ou a compostos sulfídricos	3

Figura 19. Escala Torry usada na avaliação sensorial em cozido de linguado-do-Senegal (descabeçado e eviscerado), dourada (filetes) e de filetes de dourada e robalo, pré-tratados em SGS. Adaptado de Howgate (1982).

Para avaliação da amêijoia-boia cozida, imediatamente a seguir à avaliação em cru (realizada de manhã), colocou-se cerca de 300 a 400 g de exemplares vivos (*pool* das réplicas consideradas aceitáveis na avaliação em cru) em água, durante duas a três horas e lavou-se em água corrente, imediatamente antes da cozedura. As amostras foram colocadas num tabuleiro em inox e cozidas a 100 °C, durante 2 minutos, no cozedor a vapor Rational. O painel, constituído por seis provadores, avaliou a intensidade dos atributos considerados, usando a escala presente na Figura 20. Relativamente à textura utilizou-se a terminologia descrita para textura semi-sólida e sólida (Meilgaard *et al.*, 1999: 181 – 183).

2.8. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi realizado no software Statistica, vers. 5.0 e 6.1 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK 74104, USA). Testaram-se os pressupostos de ajustamento dos dados à distribuição normal e de homogeneidade de variâncias (Zar, 1999). Em geral, não se verificaram violações graves destes pressupostos, pelo que se aplicaram métodos paramétricos para comparação dos grupos em estudo: teste *t-Student* para dois grupos e análise de variância (ANOVA), no caso de três ou mais grupos, seguida do teste de comparação múltipla Tukey.

Aplicou-se a análise de regressão linear simples, entre diferentes variáveis (índice de qualidade, sabor e cheiro) e o tempo de conservação em gelo, para avaliação das alterações da frescura de linguado e dourada, produzida em diferentes sistemas de cultura (Zar, 1999: 324-353).

Testaram-se as diferenças entre as regressões dos diferentes grupos por comparação dos declives e das alturas (Zar, 1999: 360-375). Realizaram-se algumas correlações entre os dados sensoriais e resultados químicos. Todos os testes foram realizados ao nível de significância $\alpha = 0,05$ considerando-se significativa a diferença entre grupos sempre que $p < 0,05$ (Zar, 1999), excepto nos casos indicados.

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						
	Amoniacaal						
	Sulfídrico, pútrido						
Aspecto/ /Cor (parte edível)	Brilho da superfície	Baça, opaca					Muito brilhante
	Cor creme-marfim, nacarada						
	Cor branca, leitosa						
	Cor amarelada, acastanhada						
Sabor	Adocicado, característico, a mar						
	Amargo, ácido						
Textura	Firmeza	Mole					Muito firme
	Elasticidade	Pastosa ^a					Elástica
	Suculência	Seca					Húmida, succulenta

^a Adere aos dentes/palato

Figura 20. Escala categórica usada na avaliação sensorial de amêijoas cozidas, durante a conservação a $6,1 \pm 0,7$ °C.

CAPÍTULO 3

FRESCURA E CONSERVAÇÃO ÚTIL EM GELO DE PEIXE DE AQUACULTURA

O consumo de peixe fresco (inteiro) em Portugal, tal como em Espanha, é ainda significativo comparativamente com outros países da Europa. Em 2009, a estimativa deste consumo em Portugal representou cerca de 18 % do total de pescado consumido (DGPA, 2009) enquanto que em alguns países da Europa, com excepção da Espanha, o consumo de peixe fresco inteiro não excede os 13 % (Brunsø *et al.*, 2008). Presentemente, o pescado fresco provem quer da pesca quer da aquacultura, sendo expectável que no futuro a produção aquícola para fins alimentares exceda a produção pesqueira (CE, 2009; FAO, 2009b; INE, 2009). A manutenção do consumo de pescado *per capita* e o actual estado dos recursos exigem uma actividade aquícola sustentável, o cumprimento de normas de conduta adequadas e a disponibilização de informação conveniente ao consumidor, para que este saiba orientar as suas opções e diferenciar os produtos. Assim, é indispensável conhecer os factores que mais influenciam a qualidade do peixe proveniente de aquacultura.

A maior parte dos consumidores não é capaz de distinguir entre peixe selvagem e de cultivo (Damsgård, 2008b) e muito menos entre produtos provenientes de produção extensiva ou semi-intensiva e os de cultura intensiva. No entanto, muitos consumidores consideram o peixe de aquacultura de menor qualidade, comparativamente ao peixe selvagem, sobretudo devido à textura, que tem sido referida como sendo mais branda, e por vezes a um sabor residual a terra ou a ração (Paterson *et al.*, 1997; Grigorakis, 2007). Alguns trabalhos referem que o peixe produzido em sistemas de baixa densidade, como o extensivo e semi-intensivo, apresenta características morfológicas mais semelhantes ao peixe selvagem, do que o peixe de cultura intensiva (Grigorakis, 2007). Todavia, a frescura representa o principal atributo de qualidade do pescado, uma vez que condiciona a sua aceitação e, conseqüentemente, o seu valor comercial.

De um modo geral, os consumidores têm um referencial de frescura para peixe inteiro baseado na observação do aspecto exterior, nomeadamente o brilho, a cor e muitas vezes a iridescência da pele, presença ou ausência de muco e forma e aspecto dos olhos. Os grossistas e retalhistas, para além da análise destes atributos têm também em consideração, no caso do peixe selvagem, a zona de captura, a arte de pesca e o tamanho. Estas observações são úteis para prever o tempo de conservação útil, aspecto que para os grossistas e retalhistas se reveste da maior importância, pois quanto mais longo for este período mais interessante será a comercialização da espécie em causa. Deste modo, os métodos de avaliação da frescura revestem-se de elevada importância, com destaque para a avaliação sensorial.

A importância da avaliação sensorial levou a UE a propor tabelas para avaliação da frescura de diversas espécies selvagens (CE, 1996) Todavia, estas tabelas foram desenvolvidas para grupos de espécies (peixes azuis, peixes brancos, esqualos, cefalópodes e crustáceos) e não para nenhuma em particular. Deste modo, os descritores indicados nem sempre são os mais adequados por não permitirem

descrever, convenientemente, as alterações que efectivamente têm lugar durante a conservação de cada espécie. As deficiências destas tabelas levou ao desenvolvimento de esquemas alternativos mais objectivos, como é o caso do QIM, que contempla as características de cada espécie e o seu padrão de degradação (Nunes *et al.*, 2007; Martinsdóttir *et al.*, 2009b).

No que se refere ao peixe proveniente de aquacultura têm sido desenvolvidos esquemas QIM para diferentes espécies, como a dourada, o robalo, linguado-legítimo, pregado e salmão (Huidobro *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2007; QIM-Eurofish, 2009). No entanto, alguns dos esquemas incluem demasiados parâmetros e descritores encontrando-se, por isso, pouco optimizados. O expectável desenvolvimento do sector aquícola vai exigir esquemas mais ajustados às características de cada espécie, pelo que o estudo da evolução da frescura e dos factores potencialmente influenciadores, para cada espécie, assume especial importância.

De entre estes factores, a densidade de cultivo, as práticas de captura, os métodos de abate, o manuseamento e temperatura a que o peixe permanece durante a conservação têm sido apontados como potenciais influenciadores da qualidade do peixe de cultivo (Paterson *et al.*, 1997; Poli *et al.*, 2005; Damsgård, 2008b). Os seus efeitos podem condicionar a frescura inicial, mas também o padrão de alterações que irá ter lugar durante a conservação e, conseqüentemente, o período de conservação útil (Huss, 1995; Paterson *et al.*, 1997). No entanto, são escassos os estudos focados na evolução da frescura e no período de conservação útil em gelo, em função das condições de cultura, em particular da densidade de cultivo.

Nos últimos anos a investigação no domínio da aquacultura tem dedicado algum esforço no desenvolvimento de diversas metodologias analíticas, que permitam a distinção de peixe cultivado nos diferentes sistemas de produção (Martinez, 2006). Actualmente, existe particular interesse na diferenciação do peixe cultivado em regimes de baixa densidade, como o extensivo e semi-intensivo, representantes da aquacultura costeira, do de produção intensiva. Acresce que à aquacultura costeira é também reconhecido um valor biológico e patrimonial, uma vez que contribui para a manutenção de ecossistemas costeiros (como salinas, lagoas, deltas e até zonas húmidas), importantes para a conservação da biodiversidade e de um tipo de paisagem natural, assegurando uma aquacultura sustentável (Queffelec *et al.*, 2009). Esta questão assume especial importância no caso de países cuja produção aquícola assenta fundamentalmente na aquacultura costeira, como é o caso de Portugal, através da produção de bivalves e de peixe (Quadro 2). Outros países do Sul da Europa apresentam também produção considerável neste tipo de sistemas, como é o caso do Sul de Espanha e Itália (CE, 2008).

Deste modo, são necessários critérios de qualidade, quer para as espécies emergentes, cuja produção não está ainda totalmente estabelecida, como é o caso do linguado-do-Senegal (*Solea senegalensis*) quer para as espécies cujo mercado se encontra saturado, como é o caso da dourada (*Sparus aurata*).

O linguado-do-Senegal constitui uma aposta na produção aquícola em Portugal (Quadro 2). Apesar de já existirem pisciculturas que controlam todo o processo de produção desta espécie, num regime intensivo, a produção assenta principalmente em sistemas semi-intensivos, associados à produção de robalo e dourada em tanques de terra, num sistema de policultura (INE, 2009). Trata-se de uma espécie de elevado valor comercial, à semelhança do pregado, pois tem grande aceitação por parte dos

consumidores, devido às suas características organolépticas *sui generis*, nomeadamente a textura e sabor.

Pelo contrário, a dourada constitui uma espécie cuja produção se encontra bem estabelecida, sendo produzida numa vasta gama de regimes, com predominância dos regimes intensivo e semi-intensivo em Portugal e Sul de Espanha. Esta espécie ocupa o 5º lugar na produção total da UE (CE, 2008) e o 2º em Portugal (Quadro 2), assistindo-se a uma certa saturação do mercado, sobretudo devido à concorrência da Grécia. Esta situação tem provocado uma quebra nos preços e nos rendimentos dos produtores aquícolas, exigindo medidas que possam conduzir à valorização desta espécie.

Tendo em conta que o padrão de deterioração é dependente da espécie, o conhecimento das características identificadoras de um elevado grau de frescura, que permitam caracterizar a sua evolução e estimar a rejeição do peixe, é fundamental para minimizar as perdas, durante toda a cadeia de comercialização e contribuir para a valorização das espécies provenientes de aquacultura. Assim, os trabalhos, cujos resultados se encontram publicados nos artigos 1 e 2, visaram avaliar as alterações da qualidade de linguado-do-Senegal e de dourada, durante a conservação em gelo, de modo a definir o período de conservação útil e estabelecer critérios de qualidade para ambas as espécies. No caso do linguado, pretendeu-se seleccionar os parâmetros sensoriais, bem como os descritores que melhor traduzem as alterações da frescura, com vista a otimizar um esquema QIM para esta espécie emergente. No caso da dourada, pretendeu-se avaliar o efeito do sistema de cultura na frescura e no período de conservação útil. Tendo em conta que esta é uma espécie com maior número de estudos sobre a sua frescura, pretendeu-se ainda realizar uma análise crítica dos resultados obtidos com os publicados, abrangendo diferentes sistemas de cultura e práticas de abate, de modo a definir o período de conservação útil mais real e validar o esquema QIM para esta espécie.

3.1. Frescura e critérios de qualidade de linguado-do-Senegal

Neste estudo avaliaram-se as alterações da frescura durante a conservação em gelo de três lotes de linguado-do-Senegal, produzidos em regime intensivo e semi-intensivo. Os resultados evidenciaram correlações lineares significativas entre os vários parâmetros avaliados e o tempo de conservação em gelo, principalmente os que caracterizam o aspecto do lado ocelado e a forma e cor dos olhos. Em relação ao aspecto do lado ocelado, as depressões dorsais na pele, ao longo da linha lateral, ausentes em peixe muito fresco e visíveis a partir do 4º dia de conservação, revelaram-se um descritor muito objectivo, bem como a descoloração púrpura ao longo das barbatanas, particularmente observável no lado cego (devido à sua cor branca). O estudo permitiu seleccionar descritores mais objectivos para cada parâmetro, otimizar o esquema QIM inicial e propor um QI ajustado a 22 pontos de demérito. O índice QI correlacionou-se significativamente com as alterações do cheiro e do sabor do peixe cozido, que permitiram estabelecer um período de conservação útil em gelo, de 15 dias, importante para a previsão do tempo de conservação residual (período em que esta espécie permanecerá com qualidade sensorial aceitável, nas mesmas condições de conservação).

A formação de compostos químicos, como o TVB-N e TMA-N, não foi significativa durante todo o período de conservação de 17 dias. Tal facto poderá relacionar-se com os baixos valores de TMAO-N (valores iniciais médios próximos de 3 mg N/100g) e/ou número limitado de bactérias redutoras do OTMA.

Do mesmo modo, não se verificou a formação de amins biogénicas, talvez devido ao baixo teor de aminoácidos livres, seus precursores, cuja concentração se manteve praticamente constante, próxima de 0,3 g/100 g músculo (indicando ausência de proteólise relevante). Por outro lado, a baixa actividade de bactérias descarboxilantes constitui outro factor condicionante da produção de amins biogénicas (Ten Brink *et al.*, 1990; Jørgensen *et al.*, 2000). Qualquer das causas referidas anteriormente pode estar associada à presença de factores inibidores da actividade bacteriana. Campos *et al.* (2006) referem a predominância de bactérias ácido lácticas como factor principal para a deterioração lenta de pregado refrigerado. Este processo pode dever-se à competição destas bactérias com as bactérias degradativas específicas Gram negativas, geralmente responsáveis pela deterioração de pescado (devido à produção de amins biogénicas, TMA-N e sulfureto de hidrogénio) mas também à actividade anti-microbiana de alguns dos seus metabolitos, como ácidos orgânicos e bacteriocinas.

A taxa de degradação nucleotídica, reflectida pelo índice K_i , usualmente utilizado como indicador químico de frescura, correlacionou-se significativamente com o tempo de conservação em gelo. Os valores registados para este índice variaram entre 2,3 ao início e 35,3 % no final do período de conservação. Tejada *et al.* (2007) observaram valores de K inferiores a 40 % para a mesma espécie, igualmente proveniente de aquacultura, no final do período de aceitabilidade sensorial de 22 – 25 dias em gelo. A correlação significativa entre o K_i e os dados sensoriais permitiu propor os seguintes critérios de qualidade: $QI \leq 3$ pontos de demérito e $K_i \leq 5$ %, corresponde a linguado muito fresco; $QI \leq 7$ pontos de demérito e $K_i \leq 12$ %, corresponde a linguado ainda fresco enquanto que $QI \leq 18$ pontos de demérito e $K_i \leq 40$ % corresponde a linguado de qualidade aceitável.

3.2. Influência das condições de cultura na frescura e conservação útil de dourada

Estudaram-se as alterações da qualidade durante a conservação em gelo de dourada cultivada em sistemas intensivos e semi-intensivos. Não se verificou efeito significativo do sistema de cultura na frescura inicial de dourada nem nas alterações da qualidade durante a conservação em gelo desta espécie, registando-se um período de aceitabilidade sensorial entre 13 e 14 dias. A análise crítica dos resultados obtidos e a sua comparação com os estudos publicados, permitiu definir um período de conservação útil de 14 dias, com base num critério sensorial, complementado com critério microbiológico. Foi também possível introduzir pequenos ajustes no esquema QIM, corrigindo o índice de qualidade inicial de 16 para 15 pontos de demérito. Tal como para o linguado, registou-se correlação significativa entre o QI e o índice químico K_i , permitindo propor os seguintes critérios de qualidade: $QI \leq 4$ pontos de demérito e valores de $K_i \leq 6$ %, corresponde a dourada muito fresca; $QI \leq 8$ pontos de demérito e $K_i \leq 20$ %, corresponde a dourada fresca enquanto que $QI \leq 13$ pontos de demérito e $K_i \leq 40$ % corresponde a dourada de qualidade aceitável. Os resultados da formação de compostos azotados voláteis indicam que valores de TVB-N e TMA-N superiores a 30 e 4 mg N/100g músculo, respectivamente, constituem indicadores de baixa qualidade para esta espécie.

CAPÍTULO 4

INOVAÇÃO E VALORIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AQUACULTURA

A produção intensiva na UE de algumas espécies aquícolas, associada a alguma monotonia na apresentação, tem contribuído para uma certa desvalorização da dourada e em menor escala do robalo (CE, 2009). Deste modo, o desenvolvimento de novas formas de apresentação na comercialização, designadamente produtos frescos, prontos a cozinhar, como peixe limpo (escamado e eviscerado), postas e filetes, pode constituir uma alternativa de valorização da produção aquícola, em particular no caso de espécies cujo mercado se encontra já saturado. Esta mudança na comercialização assume especial relevância no caso de Portugal, uma vez que o mercado deste tipo de produtos se encontra ainda por explorar, conforme se verifica pela balança comercial dos produtos da pesca e aquacultura (DGPA, 2009; INE, 2009). Além disso, este tipo de produtos pode contribuir para aumentar o consumo de pescado fresco, uma vez que estas apresentações vão de encontro às expectativas do consumidor actual que exige produtos de confiança e fáceis de preparar.

O segmento de mercado associado aos filetes de peixe fresco e peixe fresco pré-embalado tem vindo a aumentar na Europa, correspondendo já a cerca de 23 % do consumo de pescado na vizinha Espanha e a 38 % na Bélgica (Brunso *et al.*, 2008). Em Portugal, esta tendência parece estar a solidificar-se, embora sejam necessários estudos sobre a atitude e preferências dos consumidores, relativamente aos produtos da pesca e aquacultura. Por outro lado, os produtos frescos convenientes parecem ter cada vez maior importância no sector da restauração e *catering*, como meio de diminuir os resíduos produzidos.

Estas novas formas de apresentação acrescentam valor aos produtos, exigindo, todavia, maior poder de compra por parte do consumidor. Deste modo, este tipo de produtos destina-se, pelo menos numa fase inicial, a nichos de mercado quer em Portugal quer nos mercados do Norte da Europa, cujos consumidores estão habituados a outras espécies que não as produzidas nos países do Sul da Europa. Em geral, a maior parte da produção aquícola portuguesa é praticamente consumida no país, sendo a comercialização para o mercado internacional muito limitada. Em 2007, as principais espécies vendidas foram o mexilhão, robalo e pregado, representando respectivamente 44, 10 e 58 % da produção nacional (INE, 2009). A ostra japonesa constituiu uma excepção, uma vez que toda a produção foi vendida para o mercado internacional. O sector aquícola nacional pode conquistar vantagem económica e de sustentabilidade se apostar numa produção aquícola de qualidade, privilegiando não só os factores de cultura/maneio e de conservação, conforme foi analisado no capítulo 3, mas também na diversificação dos produtos apresentados.

O pescado fresco é um produto muito perecível, pelo que a utilização de novas tecnologias de conservação, combinada com boas práticas de higiene durante a preparação e uma adequada cadeia de frio, durante a distribuição e comercialização são indispensáveis para assegurar a oferta de produtos de

elevada frescura e qualidade (Leistner e Gorris, 1995; Church 1998; Leistner, 2000; Sivertsvik *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004)

De entre as novas tecnologias de conservação, os diferentes sistemas de embalagem activa, designadamente os absorventes de O₂ (Vermeiren *et al.*, 1999; Ozdemir e Floros, 2004), o pré-tratamento SGS (Sivertsvik *et al.*, 2004a,b) bem como a embalagem MAP convencional (Sivertsvik *et al.*, 2002), aplicadas isoladamente ou combinadas, possibilitam o desenvolvimento de produtos frescos convenientes, indo de encontro à procura dos consumidores mais exigentes que valorizam produtos cuja tecnologia não altere as propriedades sensoriais e nutricionais, associadas a pescado fresco. A utilização de absorventes de O₂ bem como o pré-tratamento SGS incluem-se no conceito de embalagem em atmosfera modificada, exigindo igualmente a utilização de filmes com baixa permeabilidade aos gases.

A comercialização de pescado embalado em atmosfera modificada não está totalmente difundida, existindo ainda algumas reservas devido não só ao possível crescimento de *C. botulinum*, principalmente em condições de baixa concentração de oxigénio, mas também à pequena extensão do período de conservação útil, comparativamente com o que se regista com outros produtos alimentares, nomeadamente a carne (Church, 1998; Gram, 2001; Sivertsvik *et al.*, 2002). Todavia, continua a existir interesse em recorrer à tecnologia MAP como forma de manter a frescura inicial do produto durante mais tempo (Devlieghere *et al.*, 2004; Peck *et al.*, 2008). Na Europa a comercialização deste tipo de produtos não está uniformizada, registando-se predominância de produtos cárneos e massas frescas. No Reino Unido, no período de 2000 – 2005 vendeu-se, anualmente, uma média de 715 milhões de embalagens de pescado embalado em MAP (incluindo peixe fumado embalado sob vácuo) e 2 milhões de embalagens de mexilhões (cozidos, embalados sob vácuo e vivos, embalados em MAP convencional) (Peck *et al.*, 2008). Em Portugal, já se encontra pescado embalado em atmosfera modificada (designada comercialmente como atmosfera protectora), sobretudo nas grandes superfícies, destacando-se os filetes de peixe-espada-preto e lombos de salmão.

Deste modo, os estudos cujos resultados se encontram publicados nos artigos 3 e 4, pretenderam avaliar a qualidade de produtos convenientes, preparados a partir de dourada e robalo, bem como a eficácia da utilização de embalagem activa, designadamente o uso de absorventes de O₂, e da aplicação do pré-tratamento SGS com CO₂, combinado com a embalagem sob vácuo, na preservação da qualidade e prolongamento do período de conservação útil daqueles produtos.

A utilização de embalagem MAP convencional pode ainda constituir um método para a manutenção de um nível de excelência da qualidade de produtos altamente valorizados do ponto de vista gastronómico, como é o caso dos moluscos bivalves vivos, em particular a amêijoia-boia. Peck *et al.* (2008) fazem referência a um período de conservação útil entre 6 a 9 dias para mexilhões vivos embalados em MAP. Os bivalves produzidos em Portugal são maioritariamente comercializados vivos, embalados em sacos de rede (usualmente embalagens de 1 kg), desde que cumpram os requisitos estabelecidos nos Regulamentos (CE) 853/2004 e 1441/2007 (CE, 2004; CE, 2007), de modo a garantirem a sua viabilidade e salubridade (IPIMAR, 2008). Usualmente os sacos de rede são colocados na zona de peixaria, sem acondicionamento em gelo, não estando bem caracterizada a sua viabilidade nem a qualidade sensorial. Por outro lado, existem poucos trabalhos publicados sobre a aplicação de novas tecnologias na conservação de bivalves vivos. Pastoriza *et al.* (2004) testou a utilização de misturas

gasosas ricas em O₂ na conservação de mexilhão, verificando uma diminuição da mortalidade e um efeito benéfico na qualidade deste produto.

O cultivo de amêijoia-boia constitui uma das actividades de maior significado económico na exploração de recursos vivos naturais em Portugal, com destaque para a Ria Formosa, no Algarve (IPIMAR, 2008). Em 2007, a produção desta espécie correspondeu a um valor de 18 364 000 Euros, representando cerca de 45 % do valor total da produção aquícola daquele ano e quase 90 % do valor total da produção de moluscos (Quadro 2). A maior parte dos bivalves é usualmente consumida apenas levemente cozinhada, de modo a manter as suas propriedades organolépticas muito particulares e muito apreciadas pelos portugueses.

Assim, O estudo publicado no artigo 5 teve como objectivo avaliar a eficácia de uma mistura gasosa, rica em oxigénio, na manutenção da qualidade de amêijoia-boia viva, em comparação com o método tradicional de conservação em sacos de rede ao ar.

4.1. Dourada conservada em embalagem activa

Neste estudo avaliaram-se as alterações da qualidade de dourada escamada e eviscerada, embalada em ar com absorventes de O₂ (FTE), comparando com um controlo embalado em ar (CAE) e com um lote conservado em gelo (CGE). A seleção da temperatura de conservação para os lotes embalados (5 °C) pretendeu simular as condições de comercialização de produtos frescos embalados e garantir a máxima eficiência dos absorventes de O₂, que é maior a temperaturas mais elevadas.

Os resultados evidenciaram elevada eficácia dos absorventes na redução da concentração de O₂ no interior das embalagens activas, registando-se uma diminuição de aproximadamente 54 % nos níveis de O₂ entre o início e o 2º dia de conservação e valores muito próximos de 0 % a partir do 6º dia (inclusive). Todavia, esta redução do O₂ não se reflectiu significativamente ao nível dos parâmetros de qualidade do produto.

No que respeita ao crescimento microbiológico nos lotes embalados, registaram-se os valores mais baixos de TVC (resultantes da incubação em aerobiose) no lote embalado com absorventes de O₂, embora não se tenha observado diferenças nos valores resultantes da incubação em anaerobiose. Comparativamente, verificaram-se os valores mais baixos de TVC no lote CGE, provavelmente devido a um efeito de lavagem do peixe pela água de fusão do gelo. O limite de 10⁷ cfu/g, estabelecido para pescado não processado (ICMSF, 1986; IFST, 1999) foi ultrapassado apenas no lote embalado em ar, no final do período de conservação (10 dias).

A evolução do índice químico K_i, evidenciou menor nível de degradação nucleotídica no lote conservado em gelo, em comparação com os lotes embalados, cujos valores não diferiram significativamente.

Relativamente à formação de compostos azotados, verificou-se um ligeiro aumento do valor inicial de TVB-N, de 19 mg N/100 g, para valores próximos de 25 mg N/100 g, no final do período de conservação, nos três lotes de dourada.

No que respeita aos indicadores de oxidação lipídica, registaram-se os teores mais baixos de MDA no lote conservado em embalagem activa, cujos valores diferiram significativamente dos verificados para os outros dois lotes, principalmente do lote embalado em ar. Este resultado sugere uma potencial

vantagem da embalagem activa, com absorventes de O₂, no caso de peixe com um teor de gordura superior ao valor de 4 %, registado no presente trabalho.

Relativamente à qualidade sensorial, não se verificaram diferenças significativas nos valores do índice de qualidade entre os três lotes de dourada, embora no final do período de conservação se tenham registado valores de QI ligeiramente mais baixos no produto embalado (8, 9 e 11 pontos de demérito para os lotes FTE, CAE e CGE, respectivamente). Esta diferença deveu-se sobretudo ao melhor aspecto. Considerando também os resultados microbiológicos, o produto manteve-se aceitável por um período de 10 dias, quando conservado em gelo ou em embalagem activa e de 8 dias quando embalado apenas em ar. Alguns autores verificaram um período de conservação útil de 8 dias para robalo eviscerado, conservado em gelo (Papadopoulos *et al.*, 2003) e de 7 a 9 dias quando embalado em 50 % CO₂/30 % O₂ (Torrieri *et al.*, 2006).

4.2. Filetes de robalo e dourada pré-tratados em SGS

Neste trabalho estudou-se o efeito do pré-tratamento SGS (100 % CO₂, pressão de 2 bar, aplicado durante 30 e 60 minutos), em combinação com a embalagem sob vácuo parcial (40 mbar) e conservação a 1 °C, na qualidade de filetes de dourada e de robalo, comparando com filetes não tratados, igualmente embalados sob vácuo parcial (controlo).

Verificou-se um efeito bacteriostático do CO₂, bastante evidente no caso dos filetes de dourada, realçando a importância da qualidade inicial do pescado na eficácia deste gás, no que respeita à inibição do crescimento microbiano. No entanto, não se observaram diferenças consideráveis nos valores de TVC, em consequência dos dois tempos de tratamento (30 e 60 minutos). No final do período de conservação (15 dias), registaram-se valores de TVC inferiores ao limite de 10⁷ cfu/g, estabelecido para pescado não processado (ICMSF, 1986; IFST, 1999), nos filetes tratados e controlo.

Os valores de TMA-N, bem como os de TVB-N, usualmente relacionados com actividade enzimática endógena e bacteriana, mantiveram-se praticamente inalterados durante todo o período de conservação, registando-se, em geral, valores médios inferiores a 0,7 e 22 mg N/100 g, respectivamente, independentemente da espécie e do pré-tratamento.

No que diz respeito à qualidade sensorial, observou-se um efeito positivo do pré-tratamento SGS, sobretudo no caso de filetes tratados durante 60 minutos. Considerando como critério de rejeição os atributos cheiro e sabor dos filetes cozidos, a aceitabilidade sensorial dos filetes sem tratamento manteve-se até 6 e 13 dias, no caso de dourada e robalo, respectivamente. A aplicação do pré-tratamento SGS com CO₂ aumentou este período para 9 e 13 dias, no caso do tratamento de 30 minutos, respectivamente para a dourada e robalo e para 13 e 15 dias, no tratamento de 60 minutos, respectivamente para a dourada e robalo. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Kostaki *et al.* (2009), que registaram um período de conservação útil de 9 a 17 dias para filetes de robalo conservados a 4 °C, no caso de serem pré-tratados com óleo de tomilho ou embalados em atmosferas contendo 40 ou 60 % CO₂ (com e sem pré-tratamento de tomilho), em comparação com 6 dias registados para o controlo, embalado em ar.

Os resultados não evidenciaram efeito negativo do pré-tratamento na textura (firmeza e suculência) dos filetes, tendo sido classificada com qualidade aceitável até ao final do período de conservação, em ambas as espécies. Tem sido referido um efeito negativo na textura de pescado tratado

com CO₂ em concentrações superiores a 50 – 60 % (Church, 1998; Sivertsvik *et al.*, 2002), devido a um aumento da perda de água no músculo. No entanto, Mendes e Gonçalves (2008) também não observaram efeito negativo na textura de filetes de dourada e robalo submetidos ao mesmo tipo de pré-tratamento (embalados apenas em ar).

Os resultados obtidos para os produtos dourada escamada/eviscerada e filetes pré-tratados em SGS com CO₂ evidenciaram um período de conservação útil entre 9 e 15 dias a temperaturas até 5 °C, definido principalmente com base num critério sensorial. Alguns autores têm chamado a atenção para o risco potencial de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico do tipo E, com formação da neurotoxina, em produtos conservados em MAP (Reddy *et al.*, 1992; Gram, 2001; Sivertsvik *et al.*, 2002). Todavia, Peck *et al.* (2008) sublinham a ausência de registos de botulismo nos últimos 20 anos, associado ao consumo de produtos alimentares embalados e refrigerados com vida útil curta (< 10 dias). Este facto pode estar associado a diversos factores de controlo não quantificados neste tipo de produtos, designadamente, elevada qualidade microbiológica da matéria prima, boas práticas de fabrico e boa cadeia de refrigeração.

No que diz respeito aos produtos preparados no presente trabalho, destinam-se a ser cozinhados antes do consumo. Em geral, o calor utilizado na confecção culinária dos alimentos é suficiente para destruir a toxina botulínica do tipo E (Gram, 2001). No entanto, não é aceitável deixar para a fase de preparação culinária a inactivação da toxina que possa estar presente no alimento. Além disso, neste tipo de produtos não foi aplicado nenhum dos factores de controlo do crescimento de *C. botulinum* (como adição de sal, diminuição do pH e/ou actividade da água, tratamento térmico). Acresce que alguns estudos evidenciam que a embalagem sob vácuo ou em atmosfera contendo CO₂ pode promover a formação da toxina botulínica, e que a embalagem em ar ou a inclusão de O₂ em embalagem MAP não pode ser encarada como uma salvaguarda (Gram, 2001; Peck *et al.*, 2008).

Deste modo, incluindo na decisão um critério de segurança, dada a severidade da toxina botulínica, é recomendado que se aceite um período de conservação útil até 10 dias, garantindo a refrigeração dos produtos a temperaturas que não excedam 8 °C (Peck *et al.*, 2008). Na verdade, este período é muito aceitável, tendo em conta o interesse em produtos com a máxima frescura. No entanto, Peck *et al.* (2008) alertam para a necessidade de continuar a desenvolver estudos com o objectivo de avaliar a real importância e variabilidade dos factores de controlo não quantificáveis, de modo a assegurar produtos convenientes, frescos e seguros.

4.3. Amêijoas-vivas conservadas em atmosfera rica em oxigénio

Estudaram-se as alterações da qualidade de amêijoas-vivas depuradas, embaladas numa mistura gasosa, contendo 70 % O₂/30 % N₂, em comparação com um controlo embalado em sacos de rede ao ar, durante um período de 6 dias de conservação a 6 °C. Não se registaram diferenças significativas na mortalidade nem no estado fisiológico dos animais em função das condições de conservação. Verificou-se em ambos os casos, uma taxa de mortalidade próxima de 12 % e bom estado fisiológico, evidenciado pelos elevados índices de condição, baixa utilização de glicogénio e valores de MDA inferiores a 0,9 mg/kg, indicador de ausência de *stress* oxidativo. Todavia, a conservação em MAP possibilitou a manutenção de maior quantidade de líquido intervalvar, que tem um papel importante na manutenção do aspecto brilhante da parte edível bem como do sabor característico.

Relativamente à qualidade microbiológica, a embalagem na atmosfera rica em O₂ não contribuiu para o aumento significativo do número de micorganismos viáveis totais, designadamente de *Pseudomonas spp*, nem de patogénicos, como a *E. coli*.

No que diz respeito à qualidade sensorial, não se verificaram diferenças significativas no grau de frescura entre as amêijoas conservadas nos dois métodos, avaliada pelo cheiro e aspecto da parte edível. Pelo contrário, na avaliação sensorial das amêijoas cozidas registaram-se algumas diferenças entre os dois lotes, que se revelaram significativas sobretudo no sabor característico (levemente adocicado). No 6º dia de conservação, este atributo foi classificado com pontuação superior ao limite de aceitabilidade estabelecido nas amêijoas embaladas em MAP, enquanto que as amêijoas conservadas ao ar foram consideradas de qualidade inaceitável. O atributo menos afectado pelo método de conservação foi a textura, mantendo as classificações muito próximas das obtidas inicialmente. Estes resultados sugerem um potencial benefício da conservação MAP rica em O₂ na preservação da frescura inicial de amêijoa-boaviva, em comparação com o método convencional em sacos de rede. No entanto, o estudo não possibilitou avaliar a real eficácia desta tecnologia pelo que serão necessários estudos complementares, comparando diferentes misturas gasosas, ricas em O₂, durante períodos de conservação mais longos.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aquacultura constitui um sector produtivo ainda de elevada expectativa, principalmente em Portugal. Representa uma alternativa de fornecimento de pescado, devido à escassez de recursos selvagens mas também porque a produção de espécies com elevado valor comercial constitui uma forte motivação em termos económicos. Todavia, para enfrentar o mercado é necessário compreendê-lo, através da percepção de todas as condicionantes que sobre ele actuam, sejam tecnológicas, regulamentares, sociais ou mesmo psicológicas. É por exemplo necessário quebrar o preconceito de alguns consumidores em relação aos produtos provenientes desta actividade, principalmente no caso das espécies piscícolas, cuja imagem é ainda negativa. Para tal, é indispensável o desenvolvimento de estudos que permitam a caracterização da qualidade destes produtos em função das condições de produção, práticas de maneo e abate bem como das condições pós-produção, designadamente o manuseamento, acondicionamento e conservação, de modo a estabelecer critérios de qualidade que possam contribuir para a valorização das espécies de aquacultura. Ao mesmo tempo, são necessários estudos que permitam caracterizar a atitude e preferências dos consumidores portugueses em relação aos produtos quer da pesca quer da aquacultura, de forma a possibilitar uma intervenção no sector aquícola conducente à melhoria da qualidade do pescado de cultura.

Os estudos apresentados na presente dissertação possibilitaram um maior conhecimento sobre os efeitos dos factores pós-abate, como as condições de conservação, directamente relacionadas com a evolução do grau de frescura, bem como dos factores de produção, em particular os sistemas de cultivo, na qualidade final de pescado proveniente de aquacultura. Os resultados obtidos permitiram definir períodos de conservação útil em gelo de 14 e 15 dias para a dourada e linguado-do-Senegal, respectivamente. No caso da dourada, verificou-se que o sistema de cultivo não influenciou a frescura inicial nem o padrão de alterações da qualidade durante a conservação em gelo.

Optimizaram-se os esquemas sensoriais QIM de ambas as espécies, obtendo-se esquemas contendo um total de 15 e 22 pontos de demérito, respectivamente para a dourada e linguado, úteis para a discriminação do grau de frescura, estimação do tempo de conservação em gelo e previsão do período de conservação residual, durante a cadeia de comercialização. O índice de qualidade (QI), revelou-se um bom critério de frescura. Valores de QI até 4 pontos de demérito podem ser utilizados como indicadores de elevado grau de frescura, valores até 8 pontos reflectem frescura enquanto que valores superiores a 13 e 14 pontos de demérito indicam qualidade inferior, próxima do limite de aceitabilidade sensorial, no caso de dourada e linguado, respectivamente.

Relativamente aos critérios químicos, complementares aos sensoriais e muitas vezes úteis na inspecção de pescado fresco, verificou-se uma evolução linear da taxa de degradação nucleotídica, representada pelo índice K_i , com o tempo de conservação em gelo. Este índice correlacionou-se

significativamente com as alterações sensoriais, em especial com o índice de qualidade, revelando-se um bom indicador de frescura quer para o linguado-do-Senegal quer para a dourada. Os resultados permitiram concluir que valores de K_f até 6 % reflectem elevada frescura em ambas as espécies, enquanto que valores superiores a 40 % constituem indicadores de baixa qualidade.

A formação de compostos associados à deterioração de pescado, como o TVB-N, TMA-N e aminas biogénicas, não foi significativa durante a conservação em gelo das duas espécies estudadas, em particular no caso do linguado-do-Senegal. Os resultados permitiram estabelecer que valores de TVB-N superiores a 10 e 30 mg N/100 g músculo e valores de TMA-N superiores a 4 mg N/100 g músculo constituem indicadores de baixa qualidade, quer para linguado quer para a dourada, respectivamente.

Em relação à diversificação dos produtos de aquacultura, através de novas formas de apresentação, os estudos desenvolvidos evidenciaram a potencialidade de comercialização de produtos frescos convenientes, prontos a cozinhar, como peixe escamado/eviscerado e filetes, preparados a partir de dourada e robalo, indo de encontro às expectativas dos apreciadores de produtos frescos e saudáveis. A utilização de embalagem activa, contendo absorventes de O_2 , bem como o pré-tratamento SGS com CO_2 , em combinação com a embalagem sob vácuo, revelaram-se eficazes na preservação da frescura de dourada escamada/eviscerada e de filetes de dourada/robalo, respectivamente. Considerando um critério de segurança, os dois tipos de produtos apresentaram qualidade sensorial aceitável até 10 dias de conservação a temperaturas $\leq 5^\circ C$, em comparação com os produtos controlo, embalados apenas em ar ou sem pré-tratamento SGS. Dado o potencial comercial deste tipo de produtos, em particular de dourada escamada/eviscerada por proporcionar diversas opções de confecção culinária, serão necessários outros estudos, designadamente comparando com a embalagem MAP convencional, para reavaliar a eficácia das tecnologias na preservação da frescura dos produtos. Será igualmente interessante otimizar esquemas QIM para estes produtos, de modo a permitir uma correcta avaliação da sua qualidade.

A conservação em embalagem MAP convencional, utilizando uma mistura contendo 70 % O_2 /30% N_2 , evidenciou a potencialidade de um benefício desta tecnologia na preservação da frescura de amêijoabo-a viva durante 6 dias de conservação a $6^\circ C$, comparativamente com a conservação tradicional ao ar. Todavia, a confirmação da sua eficácia, sobretudo na extensão do período de conservação útil, requer a realização de novos estudos, testando outras misturas, ricas em O_2 e tempos de conservação mais longos.

De entre os desafios que o sector aquícola necessita de enfrentar, para garantir a sua competitividade e sustentabilidade, as inovações ao nível da formulação de dietas e das práticas de abate assumem significado especial no contexto da Bromatologia, devido ao efeito que podem ter na qualidade do produto final.

No domínio da formulação de dietas para aquacultura, em particular para as espécies piscícolas, procura-se encontrar rações equilibradas para o crescimento animal através da utilização de fontes alternativas à farinha e óleos de peixe, mais baratas e com maior eficácia de utilização, contribuindo também para a diminuição de resíduos no ambiente. Pretende-se ainda inovar recorrendo à suplementação das rações com compostos bioactivos diversos, com objectivos distintos: por um lado melhorar a saúde animal, através do aumento da eficácia da profilaxia de patologias e da redução da aplicação de medicamentos veterinários; por outro, produzir alimentos que possam proporcionar benefícios complementares para a saúde do Homem. Em qualquer dos casos, é indispensável avaliar o efeito destas inovações na composição das rações nas propriedades sensoriais do pescado, em particular no que diz

respeito aos atributos considerados mais relevantes para a sua qualidade, como o sabor e a textura. É igualmente importante a avaliação do efeito no valor nutricional do pescado, principalmente a avaliação da bioacessibilidade no Homem dos compostos incorporados nas rações, bem como o balanço dos ácidos gordos n-3/n-6.

Do mesmo modo, as inovações que têm vindo a ser estudadas nas práticas de captura e abate, designadamente a aplicação de métodos de insensibilização pré-abate e novos métodos de abate, de modo a promover o bem-estar animal, requerem mais estudos sobre o efeito destes factores na qualidade, em especial o *rigor mortis* devido à sua influência na frescura e alterações da qualidade do pescado, mas também nas propriedades sensoriais.

Concluindo, é fundamental continuar a acompanhar os estudos relativos aos factores de produção com estudos de qualidade do produto final, pois só desta sinergia resultará uma produção de qualidade, assente em boas práticas de cultura, sustentável, que possa vir a ser certificada, com vista à sua valorização. Simultaneamente, deve proceder-se à promoção de acções de divulgação e educação do consumidor sobre a qualidade e benefícios do pescado proveniente de aquacultura.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS

- AFNOR, 2009. <http://www.afnor-validation.com/afnor-validation-validated-methods/salmonella.html> Acedido em 11/12/2009.
- AOAC, 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Ed., 4th Rev.; Association of Official Analytical Chemists International, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, CD-ROM.
- Bjerkeng, B.; Refstie, S.; Fjalestad, K.T.; Storebakken, T.; Rødbotten, M.; Roem, A. J., 1997. Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture*, 157: 297-309.
- Bligh, E.; Dyer, W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911 – 917.
- Bremner, H.A., 2000. Toward practical definitions of quality for food science. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 40: 83 - 90.
- Brunso, K.; Hansen, K.B.; Scholderer, J.; Honkanen, P.; Olsen, S.O.; Verbeke, W., 2008. Consumer attitudes and seafood consumption in Europe. *In: Improving seafood products for the consumer*. Børresen, T., Ed.; Woodhead Publishing Limited, Cambridge; pp 16-39.
- Campos, C.A.; Rodríguez, O.; Calo-Mata, P.; Prado, M.; Barros-Velázquez, J., 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*, 39: 356 - 364.
- CE, 1996. Regulamento do Conselho (CE) N° 2406/96. Fixação de normas comuns de comercialização para certos produtos da pesca. *Jornal Oficial*, L 334, 23/12/1996, pp 1-15.
- CE, 2004. Regulamento do Conselho (CE) N° 853/2004. Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial*, L 139, 30/04/2004, pp 55-205.
- CE, 2005. Regulamento da Comissão (CE) N° 2074/2005. Controlos oficiais aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial*, L 338, 22/12/2005, pp 27-59.
- CE, 2007. Regulamento da Comissão (CE) N° 1441/2007. Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial*, L 322, 07/12/2007, pp 12-29.
- CE, 2008. European Commission. Facts and figures on the CFP, edition 2008. Publications of the European Communities; Luxembourg, 2008; 37 p.
- CE, 2009. A política comum da pesca. A aquicultura na União Europeia. http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture_processing/aquaculture_pt.htm Acedido em 05/12/2009.
- Church, N., 1998. MAP fish and crustaceans – sensory enhancement. *Food Science and Technology Today*, 12 (2): 73-83.
- Cobb, B.F. III; Alaniz, I.; Thompson Jr, C.A., 1973. Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *Journal of Food Science*, 38: 431-436.

- Cordis, G.A.; Das, D.K.; Riedel, W., 1998. High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 798: 117-123.
- Damsgård, B., 2008a. Introduction to part V: seafood from aquaculture – added value possibilities and potential impacts. *In: Improving seafood products for the consumer*. Børresen, T., Ed.; Woodhead Publishing Limited, Cambridge; pp 463-464.
- Damsgård, B., 2008b. Fish welfare and ethical qualities in aquaculture. *In: Improving seafood products for the consumer*. Børresen, T., Ed.; Woodhead Publishing Limited, Cambridge; pp 490-510.
- Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14: 273-285.
- DGPA, 2009. Datapescas, Janeiro - Dezembro 2009, Nº 83.
http://www.dgpa.min-agricultura.pt/portal/page?_pageid=33,46256&_dad=portal&_schema=PORTAL&g_d=12135&cboui=12135
- Dias, J.; Conceição, L.E.C.; Ribeiro, A.R.; Borges, P.; Valente, L.M.P.; Dinis, M.T., 2009. Practical diet with low fish-derived protein is able to sustain growth performance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during the grow-out phase. *Aquaculture*, 293: 255-262.
- Donovan, T.J.; Gallacher, S.; Andrews, N.J.; Greenwood, M.H.; Guerrant, R.L.; Russel, J.E.; Roberts, R.; Lee, R., 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communicable Disease and Public Health*, 1: 188-196.
- FAO, 2009a. Aquaculture systems. http://www.fao.org/fishery/collection/glossary_aquaculture/en Acedido em 27/11/2009.
- FAO, 2009b. The state of world fisheries and aquaculture, 2008. FAO Fisheries Department, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome; 176 p.
- Farber, J.M., 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology – a review. *Journal of Food Protection*, 54: 58-70.
- Francesco, M.; Parisi, G.; Médale, F.; Lupi, P.; Kaushik, S.J.; Poli, B.M., 2004. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 236: 413-429
- Gram, L., 2001. Potential Hazards in Cold-Smoked Fish: *Clostridium botulinum* type E. *Journal of Food Science*, 66 (7), Suppl.: S-1082-S-1087.
- Gram, L.; Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121-137.
- Gras, J.; Gudefin, Y.; Chagny, F., 1978. Free amino acids and ninhydrin-positive substances in fish: I. Muscle and skin of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 60B: 369 - 372.
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 272: 55-75.
- Guillou, A.; Soucy, P.; Khalil, M.; Adambounou, L., 1995. Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 136: 351-362.
- Haard, N.F., 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25: 289 – 307.

- Halász, A.; Baráth, A.; Simon-Sarkadi, L.; Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5: 42-49.
- Hardy, R.W.; Scott, T.M.; Harrel, L.W., 1987. Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil, or tallow in diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture*, 65: 267-277.
- Henriques, M.A.R., 1998. Manual de Aquacultura. Henriques, M.A.R., Ed.; Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto; 207p.
- Hernández, M.D.; Martínez, F.J.; Jover, M.; García, B.G., 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture*, 263: 159-167.
- Howgate, P.F., 1982. Quality assessment and quality control. In: Fish Handling & Processing, 2nd edition, Aitken, A.; Mackie, I.M.; Merritt, J.H.; Windsor, M.L., Eds.; Ministry of Agriculture, Fisheries & Food, Torry Research Station: HMSO, Edinburgh; pp 177-186.
- Howgate, P., 2006. A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 341 – 353.
- Howgate, P., 2009. Traditional methods. In: Fishery products: quality, safety and authenticity. Rehbein, H., Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 19-41.
- Huidobro, A.; Pastor, A.; Tejada, M., 2000. Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65: 1202-1205.
- Huss, 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, Nº 348, Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Rome; 195 p.
<http://www.fao.org/docrep/v7180e/V7180E00.HTM#Contents>
- Huss, H.H.; Dalgaard, P.; Gram, L., 1997. Microbiology of fish and fish products. In: Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. Luten, J.B.; Borresen, T.; Oehlenschläger, J., Eds.; Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; pp 413 - 430.
- ICMSF, 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: Microorganisms in foods, vol. 2, Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies, Ed.; 2nd edition; Blackwell Scientific Publications, Oxford; pp 181-196.
- ICMSF, 1996. Clostridium botulinum. In: Microorganisms in foods, vol. 5, Microbiological specifications of food pathogens. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies, Ed.; Blackie Academic&Professional, London; pp 66-111.
- IFST, 1999. Development and use of microbiological criteria for foods. Institute of Food Science and Technology, London; 79 p.
- INE, 2009. Estatísticas da Pesca 2008. Instituto Nacional de Estatística, I.P., Lisboa; 98 p.
- IPIMAR, 2008. Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal. Silva, H.A.; Batista, I. Eds. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, 20, Lisboa; 171 p.
- ISO, 2002. Norma ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.* International Organization for Standardization, ISO, Geneve; 27 p.
- ISO, 2005. Norma ISO/TS16649-3: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. International Organization for Standardization, ISO, Geneve; 8 p.

- ISO, 2007. Norma ISO 7218 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. International Organization for Standardization, ISO, Geneva; 66 p.
- Izquierdo, M.S.; Montero, D.; Robaina, L.; Caballero, M.J.; Rosenlund, G.; Ginés, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250: 431-444.
- Jacobsen, C.; Undeland, I.; Storrø, I.; Rustad, T.; Hedges, N.; Medina, I., 2008. Preventing lipid oxidation in seafood. *In: Improving seafood products for the consumer*. Børresen, T., Ed.; Woodhead Publishing Limited, Cambridge; pp 426-460.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177: 99-115.
- Johnston, I.A., 2008. The biological basis of variability in the texture of fish flesh. *In: Improving seafood products for the consumer*. Børresen, T., Ed.; Woodhead Publishing Limited, Cambridge; pp 465-489.
- Jørgensen, L.V.; Huss, H.H.; Dalgaard, P., 2000. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 920-934.
- Karube, I.; Matsuoka H.; Suzuki S.; Watanabe E.; Toyama K., 1984. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 314 - 319.
- Knowles, T.G.; Brown, S.N.; Warriss, P.D.; Lines, J.; Tinarwo, A.; Bravo, A.; Carvalho, H.; Gonçalves, A., 2007. Effect of electrical stunning at slaughter on the carcass, flesh and eating quality of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research*, 38: 1732-1741.
- Kořakowska, A., 2003. Lipid oxidation in food systems. *In: Chemical and functional properties of food lipids*. Sikorski, Z.E., Kořakowska, A., Eds.; CRC Press LLC, Florida, USA; pp 133-166.
- Kořakowska, A.; Olley, J.; Dunstan, G.A., 2003. Fish lipids. *In: Chemical and functional properties of food lipids*. Sikorski, Z.E., Kořakowska, A., Eds.; CRC Press LLC, Florida, USA; pp 221-264.
- Konosu, S.; Yamaguchi, K., 1982. The flavour components in fish and shellfish. *In: Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Martin, R.E.; Flick, G.J.; Hebard, C.E.; Ward, D.R., Eds.; AVI Publishing Company Inc.; Westport; pp 367 - 404.
- Kostaki, M.; Giatrakou, V.; Savvaidis, I.N.; Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology*, 26: 475-482.
- Lehane, L.; Olley, J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58: 1-37.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 181-186.
- Leistner, L.; Gorris, L.G.M., 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 41-46.
- Lie ø, 2001. Flesh quality – the role of nutrition. *Aquaculture Research*, 32: 341 - 348.
- López-Albors, O.; Abdel, I.; Periago, M.J.; Ayala, M.D.; Alcázar, A.G.; Graciá, C.M.; Nathanailides, C.; Vázquez, J.M., 2008. Temperature influence on the white muscle growth dynamics of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. Flesh quality implications at commercial size. *Aquaculture*, 277: 39-51

- Love, R.M., 1980. The chemical biology of fishes. Vol. 2. Academic Pres Inc.; London; 943 p.
- Luten, J.; Schram, E., 2006. Enrichment of functional selenium in farmed African catfish (*Clarias goriepinus*) by dietary modulation. *In: Seafood research from fish to dish. Quality, safety and processing of wild and farmed fish.* Luten, J.B.; Jacobsen, C.; Bekaert, K.; Saebø, A.; Oehlenschläger, J., Eds.; Wageningen Academic Publishers, Wageningen; pp 193-200.
- Martinez, I., 2006. Revision of analytical methodologies to verify the production method of fish. *In: Seafood research from fish to dish. Quality, safety and processing of wild and farmed fish.* Luten, J.B.; Jacobsen, C.; Bekaert, K.; Saebø, A.; Oehlenschläger, J., Eds.; Wageningen Academic Publishers, Wageningen; pp 541-550.
- Martinsdóttir, E.; Schelvis, R.; Hyldig, G.; Sveinsdóttir, K., 2009a. Sensory evaluation of seafood: general principles and guidelines. *In: Fishery products: quality, safety and authenticity.* Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 411-424.
- Martinsdóttir, E.; Schelvis, R.; Hyldig, G.; Sveinsdóttir, K., 2009b. Sensory evaluation of seafood: methods. *In: Fishery products: quality, safety and authenticity.* Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 425-443.
- Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T., 1999. Sensory evaluation techniques. CRC Press LLC, 3rd edition; Florida, USA; 387 p.
- Mendes, R., 2009. Biogenic amines. *In: Fishery products: quality, safety and authenticity.* Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 42-67.
- Mendes, R.; Gonçalves, A., 2008. Effect of soluble CO₂ stabilization on the quality of fillets from farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Aquatic Food Product and Technology*, 17 (4): 342 – 366.
- Montero, D.; Robaina, L.; Caballero, M.J.; Guínés, R.; Izquierdo, M.S., 2005. Feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: a time-course study on the effect of a re-feeding period with 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248: 121-134.
- Nunes, M.L.; Batista, I.; Cardoso, C., 2007. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, 15, Lisboa; 51 p.
- Oehlenschläger, J.; Rehbein, H., 2009. Basic facts and figures. *In: Fishery products: quality, safety and authenticity.* Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 1-18.
- Ólafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I.M.; Henehan, G.; Nielsen, J.; Nielsen, H., 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 258 - 265.
- Oxoid, 2009. <http://www.oxoid.com/uk/blue/index.asp> Acedido em 30/11/2009.
- Ozdemir, M.; Floros, J.D., 2004. Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 185-193.
- Papadopoulos, V.; Chouliara, I.; Badeka, A.; Savvaidis, I.N.; Kontominas, M.G., 2003. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20: 411-420.
- Pastoriza, L.; Bernardez, M.; Sampedro, G.; Cabo, M.L.; Herrera, J.J.R., 2004. Elevated concentrations of oxygen on the stability of live refrigerated mussel stored refrigerated. *European Food Research and Technology*, 218: 415-419.

- Paterson, B., Goodrick, B., Frost, S., 1997. Controlling the quality of aquacultured food products. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 253 - 257.
- Peck, M.W.; Goodburn, K.E.; Betts, R.P.; Stringer, S.C., 2008. Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 207-216.
- Pereira, R.N.; Vicente, A.A., 2009. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2009.09.013
- Poli, B.M.; Parisi, G.; Scappini, F.; Zampacavallo, G., 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13: 29- 49.
- QIM-Eurofish, 2009. <http://www.qim-eurofish.com/> Acedido em 25/11/2009.
- Queffelec, B.; Cummins, V.; Bailly, D., 2009. Integrated management of marine biodiversity in Europe: Perspectives from ICZM and the evolving EU Maritime Policy framework. *Marine Policy* 33: 871-877.
- Reddy, N.R.; Armstrong, D.J.; Rhodehamel, E.J.; Kautter, D.A., 1992. Shelf life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. *Journal of Food Safety*, 12: 87-118.
- Regost, C.; Arzel, J.; Robin, J.; Roselund, G.; Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*). 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217: 465-482.
- Robb, D., 2002. The killing of quality: the impact of slaughter procedures on fish flesh. *In: Seafoods: quality, technology and nutraceutical applications*. Alasalvar, C.; Taylor, T., Eds.; Springer, Berlin; pp 7-16.
- Roth, B.; Imsland, A.; Gunnarsson, S.; Foss, A.; Schelvis-Smit, R., 2007. Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunning methods. *Aquaculture*, 272: 754-761.
- Ryder, J.M., 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 678.
- Sargent, J.R.; Tacon, A.G.J., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Processing Nutrition Society*, 58: 377 - 383.
- Shibamoto, T., 2006. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 12-25.
- Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A.; Burt, J.R., 1990. Postharvest biochemical and microbial changes. *In: Seafood: resources, nutritional composition and preservation*. Sikorski, Z.E., Ed.; CRC Press, Inc., Florida, USA; pp 55-75.
- Simopoulos, A.P., 2004. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, 20: 77-90.
- Sivertsvik, M.; Jeksrud, W.K.; Rosnes, J.T., 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 107-127.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Vågane, Å., Rosnes, J.T., 2004a. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 1: development and validation of experimental apparatus using a manometric method. *Journal of Food Engineering*, 61: 449 -458.

- Sivertsvik, M., Rosnes, J.T., Jeksrud, W.K., 2004b. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: raw fish fillets. *Journal of Food Engineering*, 63: 451-458
- Stammen, K.; Gerdes, D.; Caporaso, F., 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29: 301-331.
- Tejada, M., 2009. ATP-derived products and K-value determination. In: Fishery products: quality, safety and authenticity. Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 68-88.
- Tejada, M.; De las Heras, C.; Kent, M., 2007. Changes in the quality indices during ice storage of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *European Food Research and Technology*, 225: 225-232.
- Ten Brink, B.; Damink, C.; Joosten, H.M.L.J.; Huis in't Veld, J.H.J., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11: 73-84.
- Torrieri, E.; Cavella, S.; Villani, F.; Masi, P., 2006. Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Engineering*, 77: 1078-1086.
- Valente, L.M.P.; Bandarra, N.M.; Figueiredo-Silva, A.C.; Cordeiro, A.R.; Simões, R.M.; Nunes, M.L., 2007. Influence of conjugated linoleic acid on growth, lipid composition and hepatic lipogenesis in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 267: 225-235.
- van de Vis, H.; Kestin, S.; Robb, D.; Oehlenschläger, J.; Lamooij; Münkner, W.; Kuhlmann, H.; Kloosterboer, K.; Tejada, M.; Huidobro, A.; Otterå, H.; Roth, B.; Sørensen, N.K.; Akse, L.; Byrne, H.; Nesvadba, P., 2003. Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research*, 34 : 211-220.
- Vaz-Pires, P.; Nunes, M.L.; Batista, I., 2005. Terminologia de produtos da pesca e aquicultura. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, 12, Lisboa; 87 p.
- Veciana-Nogues, M.T.; Hernandez-Jover, T.; Marine-Font, A.; Vidal-Carou, M.C., 1995. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. *Journal of AOAC International*, 78 (4): 1045 - 1050.
- Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; Van Beest, M.; Kruijf, N.; Debevere, J., 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Tehcnology*, 10: 77 – 86.
- Viles, P.; Silverman, J., 1949. Determination of starch and cellulose with anthrone. *Analytical Chemistry*, 21 (8): 950-953.
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of TBA value in TCA extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 72: 1084 – 1087.
- Wan, J.; Coventry, J.; Swiergon, P.; Sanguansri, P; Versteeg, C., 2009. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science and Tehcnology*, 20: 414-424.
- Whittle, K.J.; Howgate, P., 2002. Glossary of fish technology terms.
<http://www.onefish.org/global/FishTechnologyGlossaryFeb02.pdf>
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Inc., 4th edition, New Jersey, USA; 663 p.

ARTIGO 1

**FRESHNESS AND QUALITY CRITERIA OF ICED FARMED
SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*)**

Freshness and Quality Criteria of Iced Farmed Senegalese Sole (*Solea senegalensis*)

AMPARO C. GONÇALVES,* SOFIA E. ANTAS, AND MARIA L. NUNES

Department of Technological Innovation and Upgrading of Fish Products, National Research Institute on Agriculture and Fisheries, INIAP/IPIMAR, Avenida Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal

Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is a high-value commercial species with increasing importance in aquaculture. The aim of this work was to study the quality changes of this species during chilled storage under refrigeration, through sensory and chemical methods. In particular, the optimization of a quality index method (QIM) scheme was proposed as well as the definition of sensory and chemical quality criteria. A shelf life of 15 days was reported, and a QIM scheme based on a total of 22 demerit points (dp) was proposed. Biogenic amines were never detected, and the usual spoilage indicators, such as TVB-N and TMA-N, were not significantly produced during the period of sensory-acceptable quality (15 days). On the basis of the significant correlations ($p < 0.001$) between sensory data and K_i values, a quality index (QI) ≤ 7 dp and a $K_i \leq 12\%$ correspond to a fresh fish, whereas a QI > 19 dp and a $K_i > 40\%$ indicate unacceptable quality of iced Senegalese sole.

KEYWORDS: Quality index method; freshness; sensory evaluation; chilled storage; K_i value; biogenic amines; Senegalese sole

INTRODUCTION

The type and rate of fish quality loss during postharvest handling and storage are specific for each species and depend on several conditions, such as the nutritional status of the fish, its biological state, and the temperature of storage (1). Therefore, knowledge of the specific deterioration pattern of each species is essential for better fish handling and the establishment of quality criteria. The commercial value of a fish species is associated with its excellence, which is regarded as freshness quality. The freshness of fish is related to all sensory properties (flavor, odor, texture), but the general raw appearance is extremely important because it determines its marketability and price. For that reason objective and harmonized criteria, as well as experienced panelists in fish assessment, are required to yield more objective, simple, and rapid evaluation schemes. Such schemes are particularly needed at auctions and in the fish-processing sector, as well as in the retail market, to substitute the European Union (EU) freshness grade actually used (2).

The quality index method (QIM), first developed by the Tasmanian Food Research Unit (3), is the latest scheme to overcome these difficulties and has been applied to iced whole and gutted fish, and also to other fishery products, including cephalopods, raw fillets, frozen/thawed fish, and cooked fish/shrimp (4, 5). QIM is a sensory scheme based on well-defined changes of fishery products during storage. Each attribute (quality parameter), such as the appearance (format/brightness of eyes, gill color in the case of fresh fish) and odor, is described by a maximum of four descriptors, and respective scores are

associated (5). The descriptors that correspond to high freshness are scored with 0, whereas higher scores correspond to lower quality, at a maximum of 3 demerit points (dp). The descriptors should be very simple and clear to avoid misunderstandings. The scores of all attributes are summed to give an overall score, which is the quality index (QI). As a result, the theoretical evolution of the QI initiates at 0 or at low values and increases during storage, achieving the maximum when the fish should be rejected (3, 5).

One difference between the QIM and other traditional sensory schemes is that the first is based in specific descriptors for each product or species, which implies the development and optimization of one particular scheme for each fish species or product in specific storage conditions (chilled, frozen) (3, 5). In parallel, the assessment of cooked fish is needed to establish the fish rejection and estimate the shelf life in the specific storage conditions (5).

In the case of iced fish, the linear relationship of the QI with storage time permits the prediction of the number of days that the fish was in ice [predicted storage time (PST)]. Because the shelf life in ice [estimated shelf life (ESL)] was estimated on the basis of the assessment of cooked fish, it will be possible to estimate the remaining shelf life (RSL), defined as the time in which the fish is still acceptable for human consumption ($RSL = ESL - PST$) (3, 5). It is important to note that the estimation of RSL is affected by some uncertainty due to the effect of several factors such as fish handling and storage conditions, in particular, the temperature.

QIM schemes have already been developed for several farmed fish species (4, 7), including some flatfish such as brill (*Scophthalmus rhombus*), turbot (*Psetta maximus*), and sole

* Author to whom correspondence should be addressed (telephone +351213027036; fax +351213015948; e-mail amparo@ipimar.pt).

(*Solea solea*) (5). Nevertheless, development and optimization for other species are still needed. Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is an emergent species in aquaculture, and little information is available regarding the quality changes during chilled storage, even for wild species. Although the production of this species is still not well-established, it has a high commercial value due to its delicate texture and flavor. For that reason, the primary aim of the present work was to study the sensory changes of Senegalese sole during ice storage to optimize a QIM scheme for this species. Considering the usefulness of some chemical methods as freshness/quality indicators (1, 6), the nucleotide degradation products, the volatile nitrogen compounds (TVB-N, TMA-N), and biogenic amines were also evaluated to contribute to a full characterization of the quality changes of this species and to establish some chemical freshness/quality indicators.

MATERIALS AND METHODS

Fish Source. Three different batches of Senegalese sole, fasted for 24 h before slaughter, were obtained from two Portuguese fish farms, in three different periods: July, August, and October 2005. Average length and weight were, respectively, 29.3 ± 1.8 cm and 304.4 ± 55.4 g. The fish were slaughtered by hypothermia, in an ice–water slurry. After death, fish were packed in expanded polystyrene boxes, covered by a thin plastic film, with crushed ice on the top, and transported to the laboratory.

Storage Experiments and Sampling. The delivery of fish to the laboratory occurred approximately 18 h after slaughter. Fish were conditioned in polypropylene boxes with perforated bottoms, covered by a thin plastic film with crushed ice on top. The boxes were stored under refrigerated conditions at 1.5 ± 0.8 °C, and the ice was replenished as necessary.

During the chilled storage samples were taken for sensory assessment as follows: July, August, sampling after 1, 3 or 4, 7, 9, 11, 14, and 16 days in ice; October, sampling after 1, 4, 7, 11, 15, and 17 days in ice. Samples for proximate composition were taken only at the reception day (1 day in ice). Sampling for other chemical analyses was done initially (1 day in ice) and after 4, 9, and 16 or 17 days of storage, except in the case of volatile compounds and biogenic amines, for which samples were collected initially and when the fish was sensory rejected.

Chemical Analyses. All chemical analyses were done on the fish muscle (without skin), previously minced. A minimum of three and up to five fish samples per batch were used in each sampling day.

Proximate Composition. The ash, moisture, crude protein, and fat contents were determined at day 1 by the reference methods, described in AOAC (8). *Ash* was determined by incineration of fish muscle (previously dried) in a furnace at 500 ± 25 °C until to constant weight (method 942.05). *Moisture* was determined by the air-drying method, during 12–16 h at 105 ± 2 °C in an air oven (method 950.46). *Crude protein* was determined by the Kjeldahl method, and the percentage of protein was calculated as total nitrogen $\times 6.25$ (method 981.10). *Total fat* was extracted with diethyl ether solvent in a Soxhlet apparatus (method 991.36). Sample was refluxed during 7 h at adjusted temperature. Fat was determined by weight after drying to constant weight in a 105 ± 2 °C air oven.

Total Volatile Base Nitrogen (TVB-N), Trimethylamine Nitrogen (TMA-N), and Trimethylamine Oxide Nitrogen (TMAO-N). Volatile compounds were determined in extracts from 25 g of fish mince homogenized with 50 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) by a microdiffusion method (9).

Biogenic Amines. Determination was done in the previous TCA extracts by high-performance liquid chromatography (HPLC) (10), in a LKB Biochrom LC system (Pharmacia), on a reverse phase column (Spheri-5 RP18 5 μ m, 220 \times 4.6 mm) by a gradient elution (two sodium acetate buffers, 0.1 and 0.2 M, pH 4.5; flow rate = 1.0 mL/min), followed by postcolumn derivatization with *o*-phthaldialdehyde. Detection was made in a fluorescence spectrophotometer (Perkin-Elmer LC-1) with excitation at 340 nm and emission at 455 nm. The system permits detection of histamine (Him), cadaverine (Cad), putrescine (Put),

tyramine (Tyr), and agmatine (Agm). Identification and quantification were done by comparison with specific standards (Sigma) through calibration curves, using the software EZChrom Chromatography Data System, version 6.7 (Scientific Software).

Nucleotides and Nucleotide Catabolites. Extracts were prepared from 5 g of fish mince homogenized with 25 mL of 0.6 M perchloric acid, and the separation was done by HPLC in an Agilent 1100 Series LC System, as described in ref 11 on a reverse phase column (Lichrosorb 100 RP-18 10 μ m, 250 \times 4.6 mm). Phosphate buffer (0.1 M, pH 6.95) composed the mobile phase; elution was isocratic (flow rate = 1.6 mL/min), and detection was done at 254 nm. Compounds were identified and quantified by comparison with specific standards (Sigma) through calibration curves, using the Agilent ChemStation software G2170AA (Agilent Technologies).

Free amino acids (FAA) were extracted with a solution of 10% TCA in a ratio of 1:10 (fish muscle/TCA) followed by a centrifugation step (12). FAA were separated by ion exchange liquid chromatography in an automatic analyzer Biochrom 20 (Amersham Pharmacia Biotech AB) equipped with a Peek polymeric cation exchange column (200 \times 4.6 mm), using three sodium citrate buffers (pH 3.20, 4.25 and 6.45; Amersham Biosciences) and three different temperatures (50, 58, and 95 °C). The detection of amino acids was done at 440 and 570 nm after reaction with ninhydrin reagent (Amersham Biosciences). Amino acid identification and quantification were done by comparison with specific standards (Sigma) through calibration curves, using the software EZChrom Chromatography Data System, version 6.7 (Scientific Software).

Sensory Evaluation. The sensory evaluation was carried out in a special room equipped with individual booths by a sensory panel composed of four to six experienced assessors. A minimum of three and up to five fish samples per batch were used in each sampling day. In total, 24, 24, and 25 fish samples were assessed in the trials of July, August, and October, respectively.

Raw Assessment and QIM Optimization. Each panelist assessed one fish (whole raw), but also observed the other fish samples in order to be familiar with the fish variability. Despite the experience of the panelists in sensory assessment of fish, in particular using QIM schemes, a preliminary experiment was done to train the panel on the quality parameters and descriptors for Senegalese sole and also for some adjustments in the original QIM scheme, which was first developed for sole (*Solea solea*) (5).

Sensory Assessment of Cooked Fish. After the raw assessment, the fish were gutted, headed, and washed with tap water. Each fish sample was wrapped with perforated aluminum foil and cooked for 7–8 min at 100 °C in a saturated steam oven (Rational Combi-Master CM6 Cross Kuchentechnik GmbH, Landsberg a. Lech, Germany). Each panelist evaluated all of the fish samples and gave an average score. In October cooked fish was not assessed on days 4 and 17. The panel evaluated the odor and flavor using the Torry scale for lean species (13), which was also slightly modified (Table 1) during the preliminary experiment. In addition, the panelists were asked their opinion about the texture of the fish flesh (only in qualitative terms).

An average score of ≤ 5.5 for odor and flavor is usually used as the limit of acceptability (5), and the shelf life of Senegalese sole was defined on the basis of this sensory criteria together with the autolysis level of the viscera of whole raw fish.

Viscera Evaluation. The status of the viscera was qualitatively evaluated by three assessors immediately before the gutting of fish.

Statistical Analysis. The statistical treatment of the results was performed using Software Statistica, vers. 6.1 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK). ANOVA analysis and the Tukey multicomparison test of different batches and storage days were done. A time-dependent linear regression analysis was performed for each quality parameter/descriptor and QI. Comparison of the several regression equations was done according to the method described in ref 14. Correlations between sensory and chemical variables were also done. Significance was tested at $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate Composition. Significant differences among the three independent fish batches were detected only for fat content,

Table 1. Sensory Scores for the Assessment of Cooked Farmed Senegalese Sole [Modified from Howgate (13)]

odor	flavor	score
initially weak odor of sweet, starchy, followed by strengthening of these odors	insipid; initially no sweetness but flavors with slight sweetness may develop; slightly bitter/sour aftertaste	10
weak odor of sweet, boiled meat, slightly starchy	sweet, without bitter/sour aftertaste	9
loss of odor, neutral	sweet and characteristic flavors but reduced in intensity	8
woodshavings, musty	neutral	7
boiled potato	insipid	6
slightly sour	slight sourness, off-flavors traces	5
lactic acid, sour milk, fishy odor (TMA)	slight bitterness, sour, off-flavors	4
lower fatty acids (e.g., acetic or butyric acids), decomposed grass, soapy, turnipy, tallowy	strong bitterness, rubber, slight sulfide	3

Table 2. Proximate Composition of the Flesh of Raw Farmed Senegalese Sole^a

proximate composition (g/100 g of flesh)	July	August	October
ash	1.31 ± 0.07	1.31 ± 0.01	1.32 ± 0.05
moisture	77.2 ± 0.5	74.8 ± 1.2	75.6 ± 0.7
fat	0.7 ± 0.2 a	2.4 ± 0.8 b	1.7 ± 0.1 b
protein	20.6 ± 0.3	20.3 ± 0.1	20.9 ± 0.3

^a *N* = 5 fish analyzed. Values with different letters are significantly different (*p* < 0.05).

in which the fish of the later two experiments presented the highest fat level (**Table 2**). The influence of nutrition in the composition of fish flesh is well-known (15), and the proximate composition of marine farmed fish generally reflects the diet composition, in particular, the fat level and composition (16, 17). Values in the range of 1.0–1.8% were reported for the muscle of farmed turbot fed different dietary fat levels (16), whereas levels within 0.5–9.6% were found for the muscle, fillet, or flesh of wild pleuronectiformes, turbot and Atlantic halibut (18).

Sensory Assessment of Cooked Fish. A gradual decrease of the odor and flavor scores was observed during the storage in ice, and significant differences among the three experiments were not observed (ANOVA two-way, *p* > 0.05); the storage time was responsible for the main differences reported. In general, slightly higher scores were reported for odor, but this attribute and the flavor were positively correlated ($r^2 = 0.8056$, $r = 0.8976$, $p < 0.001$), and a significant negative linear correlation between the average scores of odor/flavor and the storage time was reported (**Figure 1**). Initially (1 day in ice), the fish was very fresh (average scores of 9.8 for odor/flavor) and was characterized by a weak sweet odor, insipid to fairly sweet flavor, and slightly bitter/sour aftertaste (**Table 1**). During the further 4 days of storage a slight decline of freshness was observed, and an average score of 8.9 was reported on the fourth day. Differences between scores became significant only at the seventh day (ANOVA, *p* = 0.0388), and between days 7 and 11 the scores slightly decreased from 7.8 to 7.3, corresponding to acceptable grade of quality (regarded as musty odor and neutral flavor; **Table 1**). On days 14 and 15 the scores were very close to the limit of acceptability (5.5) (3), and slightly sour odor/flavor and off-flavor traces were perceived by the panelists; 75% of the scores reported on the 14th day were ≤ 6.5, of which 50% were ≤ 6.0, whereas on the 15th day 75% of the scores did not exceed 5.9, of which 50% were ≤ 5.5. On day 16 the average score was 5.2, and 50% were below 4.8; undoubtedly, the fish was rejected. In October the panelists rejected the fish on day 15 due to its raw appearance and on the 17th day cooked fish was not assessed.

The flavor was the attribute that most influenced the rejection of fish, although the texture (qualitatively assessed) was also an important trait for the sensory panel. Generally, the texture was considered to be somewhat mushy, and this feature became more intense during the storage, in particular in the August trial, which corresponded to the fish with the highest fat content (**Table 2**). The available data about the effects of dietary fat on the organoleptic properties of fish flesh are somewhat contradictory, and some authors did not report any effect of dietary fat level on the texture of farmed turbot (16). In the present work, such a study was not done, but the difference reported for fat content between the three fish batches suggests that influence could be imperceptible. On the 15th and 16th days the fish presented a very soft flesh and the brownish coloration along the fins evidenced some oxidation (which was also noted by a fairly rancid odor). At this time, the tenderness of fish flesh was visible even in the raw fish because in some individuals the bones were easily separated from the muscle.

These results are concordant with the viscera evaluation. At the beginning of storage the viscera were individualized and bright, but after 4 days they lose some brightness. The first signal of autolysis was noted on days 14 and 15, and on the 17th day the viscera were moderately dissolved.

Considering all of the above results, in particular the sensory assessment, a shelf life of 15 days was defined for Senegalese sole stored in ice at proper conditions (temperature below 3 °C). Similar results were found for other flatfish species, and shelf lives of 13, 14, and 15 days in ice were estimated, respectively, for whole turbot, brill and sole (5), and gutted wild turbot (average weight of 525.93 g) (19). On the contrary, a higher shelf life of 19 days was reported for iced farmed turbot, for which weight ranged between 1400 and 1900 g (20–22).

Sensory Assessment of Raw Fish—QIM Optimization. Despite the low numbers of fish assessed in the preliminary experiment, it allowed the first modifications to be introduced to the original QIM scheme, developed for sole (5), mostly related with the texture, gill coloration, and flesh color. This modified scheme (**Table 3**) was used in the further three independent storage experiments, and additional changes were made as was necessary to adjust the scheme. **Figure 2** illustrates the evolution of all the quality parameters during the chilled storage. In general, the majority of the selected parameters were useful in reflecting the quality changes of Senegalese sole, and significant linear correlations with the storage time were observed for most of them. Significant differences between the regression slopes were found only for gill odor of August and October, but it was mainly related with the high variability reported in the former experiment. An enhancement of the adjustment of the linear model to the data (higher coefficient of determination, r^2) was observed for some quality parameters during the three experiments. This was the case for the

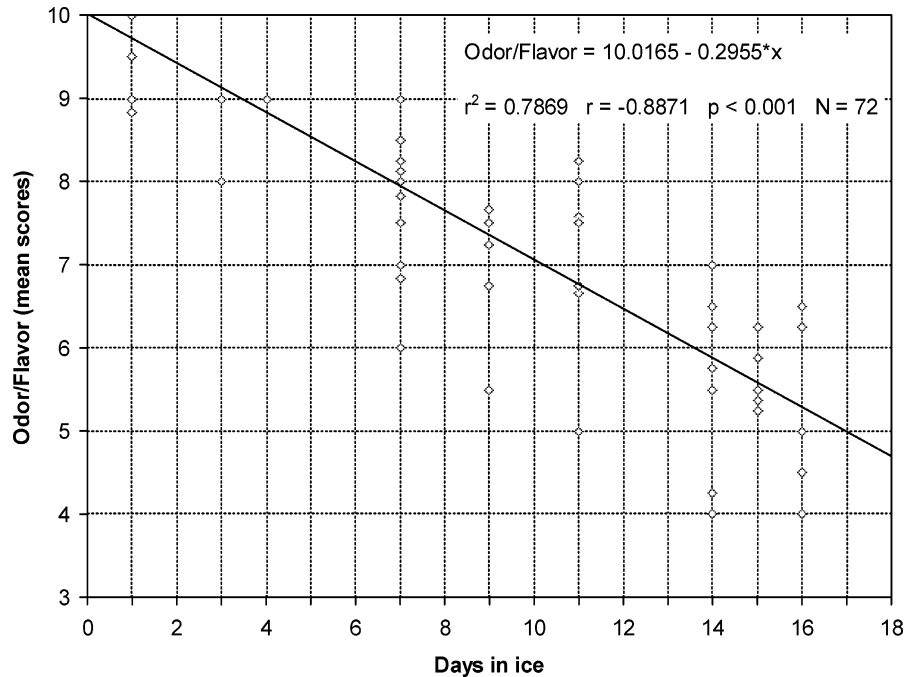


Figure 1. Linear relationship between the average scores of odor/flavor (cooked fish) and the storage time in ice for whole raw farmed Senegalese sole based on the data of three independent storage experiments (1.5 ± 0.8 °C). Score 10, very fresh fish; score 3, putrid fish.

Table 3. Initial Quality Index Method (QIM) for Freshness Assessment of Whole Raw Farmed Senegalese Sole during Iced Storage at 1.5 ± 0.8 °C [Modified from (5)]

quality parameters		descriptors/demerit points			
		0	1	2	3
skin appearance	<i>ocular side</i>	fresh, bright	rather dull or pale, somewhat shrunken skin	dull, pale, some green or purple discoloration	dull, green and purple discoloration, very shrunken skin
	<i>blind side</i>	bright white	some purple discoloration at the edges of the fins	dull, purple, yellow discoloration at fins and in the middle	yellow and purple discoloration
	<i>mucus</i>	clear, not clotted	slightly clotted and milky	clotted and slightly yellow	yellow and clotted
texture (ocular side)		firm, elastic	less firm, elastic	soft	very soft
eyes	<i>form</i>	flat, eye socket convex	slightly sunken, eye socket shrunken	sunken and or swollen, eye socket shrunken	
	<i>brightness</i>	black and clear, golden rim around the pupil	rather matte, faint golden rim around the pupil	matte, purple/ reddish	
gills	<i>odor</i>	fresh, seaweedy	neutral, metallic, rubbery	musty, sour	rotten, sour, sulfurous
	<i>color</i>	bright, light red	slightly discolored	discolored	yellowish, green/blue discoloration
	<i>mucus</i>	no mucus	clear	milky, slightly clotted	yellow, thick, clotted
flesh	<i>color</i>	translucent, bluish	slightly yellowish	yellow, discolored	waxy, opaque, yellow

quality index (QI) range: 0–28 demerit points

appearance of the blind side and the body mucus, for which low r^2 and slopes were reported for the first two experiments. Generally, the mucus was more visible in the blind side due to its white coloration.

In the case of flesh texture, although some improvement was observed, a satisfactory linear correlation was not achieved (low values of r^2 for two experiments). This parameter evolves slowly, and some variability was reported (Figure 2), even after the adjustment of the maximum score to 2 dp (October). Further evaluations will demonstrate the essentialness of this characteristic in the QIM scheme.

The earliest and most evident changes were found in the skin appearance (in particular the ocular side) as well as in the appearance/form of the eyes (Figure 2), which were the

attributes that better correlated with the storage time (highest r^2 and slopes). The maximum scores were attained at the rejection time of cooked fish (15 days in ice). The skin depression along the spinal column (Table 4) was visible in an earlier stage of storage (after 3–4 days in ice), and this descriptor was consolidated in the two last experiments. Another useful descriptor was the blue/whitish spots that were particularly visible in very fresh fish. During the storage these spots became less visible, and at the same time the skin lost the brownish pigmentation and became pale and purple discolored (Table 4).

Some fluctuation in the gill odor scores was observed (Figure 2), and the panel did not identify the descriptor “seaweed odor”; instead, they considered the fish to have an initial neutral odor

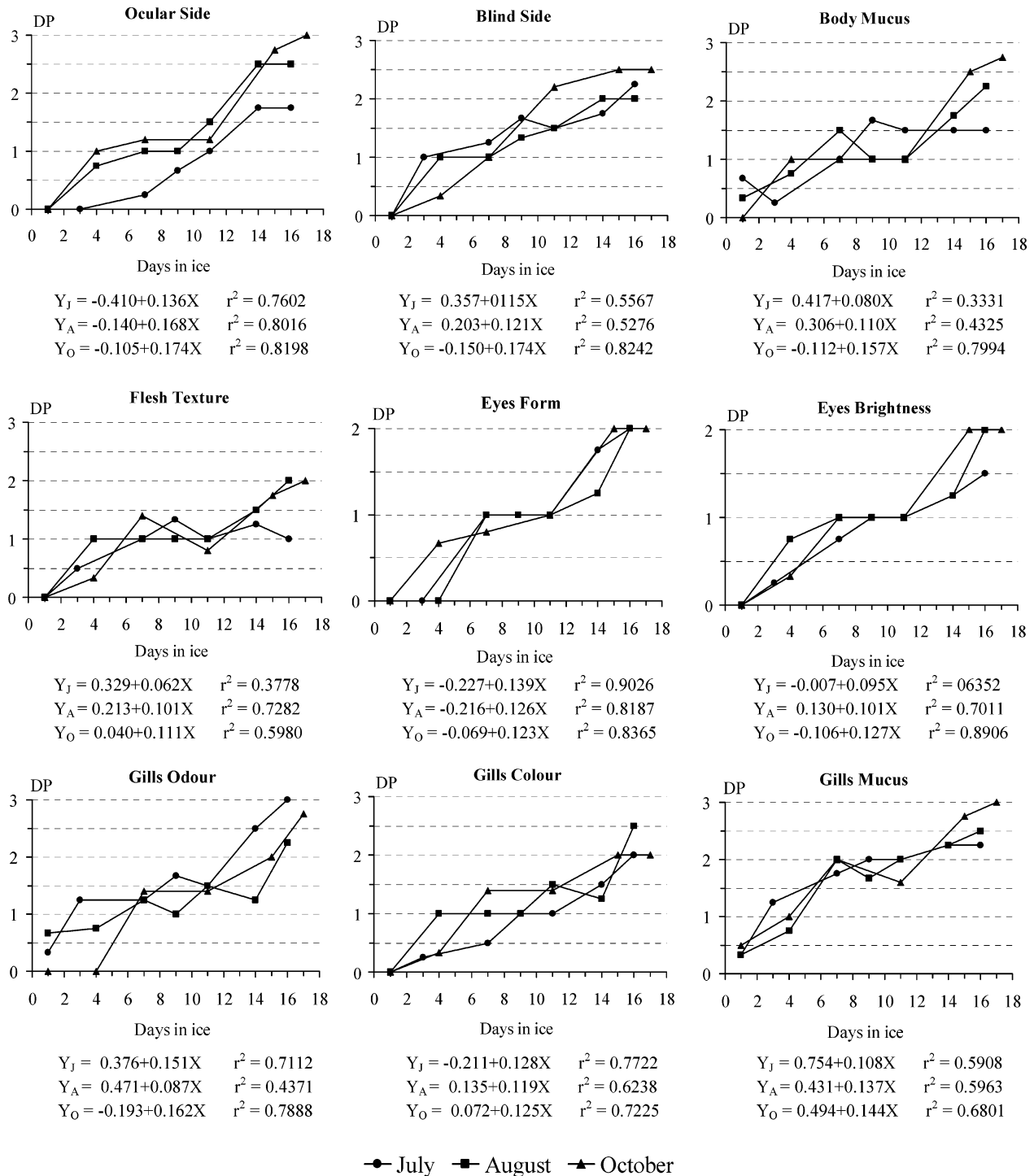


Figure 2. Evolution of raw quality parameters of farmed Senegalese sole during the iced storage at 1.5 ± 0.8 °C. Each data point is the mean value of three to five fish assessed (standard deviation ≤ 1.0). DP, demerit points; score 0, high freshness; score 3, unacceptable quality; Y_J , Y_A , Y_O , regression equations for the experiments of July, August, and October, respectively.

or a somewhat "earth odor". As a consequence, the descriptors were adjusted as presented in **Table 4**.

Regarding the color of gills, although changes were evident, the mean scores never attained the maximum of 3 dp, even after 17 days of storage (**Figure 2**). The mucus seems to be the mainly responsible for the bad appearance of gills because it was always scored with higher values than the color (**Figure 2**). Even at the rejection time of cooked fish (15th day) the maximum scores reported for the gill color were 2 dp. Therefore, the maximum score was changed to 2 dp (**Table 4**).

The flesh color (**Table 3**) was excluded from the QIM after the July experiment, in which the maximum score was not

attained even after the rejection of cooked fish (results not shown). Furthermore, the evaluation of this parameter requires the cutting of the fish surface, which compromises the sale of fish in a real market.

The successive modifications introduced in the QIM scheme allow a better adjustment of QI. In October a value around 20 dp was reported at the 15th day (rejection of cooked fish), in a total of 23 dp (**Figure 3**). On the contrary, in the previous experiments QI values close to 19 and 20 dp were obtained, in a total of 28 and 25 dp, respectively, for July and August. Nevertheless, significant differences among the three QI were not observed, which reflects well the loss of freshness through-

Table 4. Final Quality Index Method (QIM) Scheme for Freshness Evaluation of Iced Whole Raw Farmed Senegalese Sole

quality parameters		descriptors/demerit points			
		0	1	2	3
skin appearance	<i>ocular side</i>	bright brown pigmentation, blue/whitish spots evident	rather dull or pale, somewhat shrunken skin (fair skin depression a long the spinal column)	dull, pale, slight depigmentation, some purple discoloration at the edges of dorsal and anal fins, shrunken skin evident	pale, extensive depigmentation and purple discoloration at the edges of fins, much shrunken skin
	<i>blind side</i>	bright white	some purple discoloration at the edges of the fins	dull, purple/ yellow discoloration at fins and in the middle	yellow and purple discoloration
	<i>mucus</i>	abundant and clear, not clotted	slightly clotted, milky	clotted and slightly yellow	yellow and clotted
texture (ocular side)		firm, elastic, pressure signs disappear immediately	less firm, elasticity reduced	soft, presence of pressure signs	
eyes	<i>form</i>	eye socket convex	slightly sunken, eye socket shrunken	sunken and/or swollen, deformed	
	<i>clarity/brightness</i>	clear, black pupil, golden rim around the pupil	rather matte, faint golden rim around the pupil	matte, purple/reddish, milky pupil	
gills	<i>odor</i>	neutral or earth odor, fresh	metallic, rubbery	musty, sour	rotten, sulfurous
	<i>color</i>	bright light red, lamina perfectly separated	slightly discolored	discolored, yellowish, lamina adhered	
	<i>mucus</i>	no mucus	clear	milky, slightly clotted	yellow, thick, clotted

quality index (QI) range: 0–22 demerit points

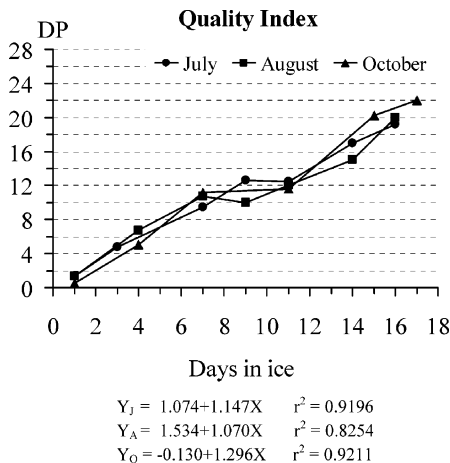


Figure 3. Quality index evolution of whole raw farmed Senegalese sole during the iced storage at 1.5 ± 0.8 °C. Each data point is the mean value of three to five fish assessed (standard deviation ≤ 1.0). DP, demerit points; score 0, high freshness; score 28, unacceptable quality; July, total 28 DP; August, total 25 DP; October, total 23 DP; Y_J , Y_A , Y_O , regression equations for the experiments of July, August, and October, respectively.

out the rise of total scores. A significant linear correlation between the QI and storage time was observed, and the three regression equations were coincidental (identical slopes and intercepts, $p < 0.05$).

Therefore, the best estimation of the quality changes of raw fish using the QI is given by the model that considers the data from the three independent storage experiments (**Figure 4**). These results are quite similar to those obtained for sole ($r^2 = 0.91$, $QI = 0 + 1.85 \times \text{days in ice}$), brill ($r^2 = 0.872$, $QI = 0 + 1.3108 \times \text{days in ice}$), and turbot ($r^2 = 0.890$, $QI = 0 + 2.205 \times \text{days in ice}$) (5).

The PST (number of days that the fish was in ice) can be predicted through the equation $PST = (QI - 0.8354)/1.1405$.

This prediction could be done at 95% confidence level through the association of confidence limits, and the PST ($PSTL_1$ and $PSTL_2$) would be calculated by the equation (23, 342–344)

$$X_{\text{Mean}} + [b(Y_{i\text{Mean}} - Y_{\text{Mean}})/K] \pm (t/K) \sqrt{(S^2_{Y,X})'[(Y_{i\text{Mean}} - Y_{\text{Mean}})^2/\Sigma x^2 + K(1/m + 1/n)]}$$

where X_{Mean} and Y_{Mean} are the mean values of days in ice (X data) and QI (Y data) from the regression model, b is the slope of the regression equation, $Y_{i\text{Mean}}$ is the mean QI value of m fish assessed, n is the number of data points comprising the regression model, m is the number fish assessed, $t = t_{\alpha(2), (n + m - 3)}$ is the critical value of t Student distribution at α level of significance (usually 0.05) and $(n + m - 3)$ degrees of freedom, $K = b^2 - t^2(S^2_b)'$, $(S^2_b)'$ and $(S^2_{Y,X})'$ are the variances, respectively, of the slope and Y values (residual mean square), Σx^2 is the sum of squared deviations from the X_{Mean} , and $PSTL_1$ and $PSTL_2$ are, respectively, the minimum and maximum days in ice estimated.

As a result of the application of confidence limits to the PST, the remaining storage days in ice (defined as $RSL = ESL - PST$) is obtained by

$$15 - PSTL_2 \leq RSL \leq 15 - PSTL_1$$

These limits could be updated when new data are available, and then its usefulness could be truly tested.

The QI significantly correlated with the changes of odor/flavor of cooked fish ($r^2 = 0.8317$, $r = -0.9120$, $p < 0.001$), which evidence the utility of the QIM scheme. Moreover, ANOVA analysis demonstrated significant differences for QI values sooner than for Torry scores (respectively after 4 and 7 days of storage, ANOVA $p = 0.015$ and $p = 0.0388$). This result suggests a higher efficacy of QIM to detect the earlier storage alterations than the assessment of cooked fish.

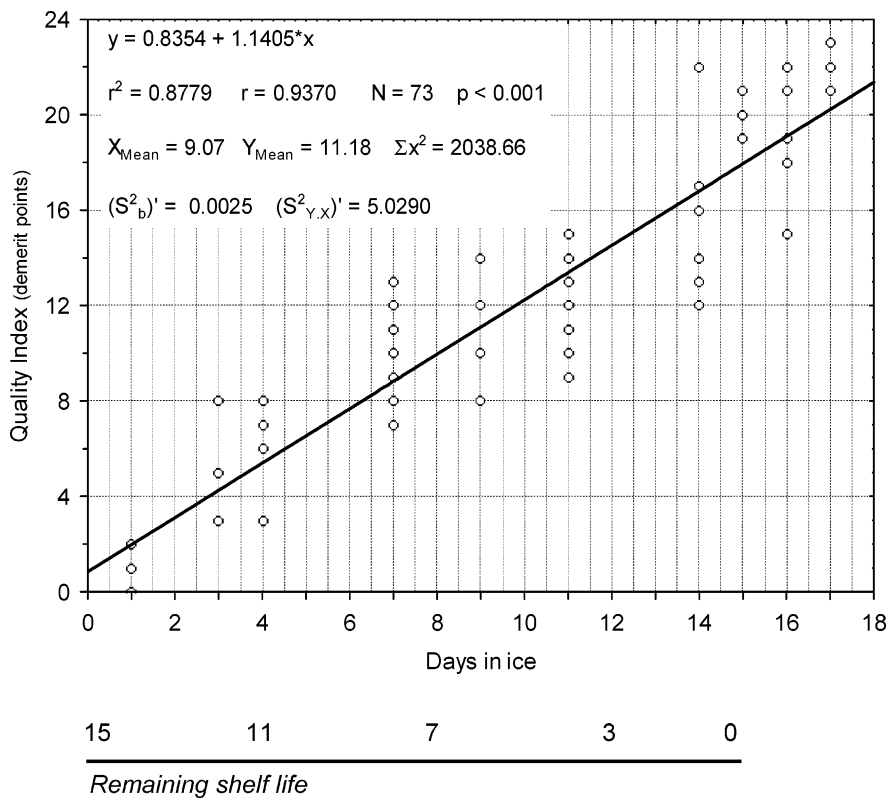


Figure 4. Linear relationship between the quality index and the storage time in ice for whole raw farmed Senegalese sole, based on the data of three independent storage experiments (storage at 1.5 ± 0.8 °C). Score 0, high freshness; score 24, unacceptable quality.

Table 5. Chemical Changes of Whole Raw Farmed Senegalese Sole during Iced Storage at 1.5 ± 0.8 °C

chemical parameters	days in ice							
	1		4		9		16–17	
	N ^a	mean \pm SD ^b	N	mean \pm SD	N	mean \pm SD	N	mean \pm SD
nucleotides (μ mol/g of flesh)								
IMP	10	6.5 \pm 0.8 a	3	6.9 \pm 0.8 a	3	6.1 \pm 0.2 a	6	3.7 \pm 1.2 b
Ino	10	0.0 \pm 0.0 a	3	0.4 \pm 0.0 b	3	0.8 \pm 0.2 c	6	0.9 \pm 0.3 c
Hx	10	0.1 \pm 0.1 a	3	0.4 \pm 0.0 ab	3	0.7 \pm 0.1 b	6	1.1 \pm 0.3 c
K _i value (%)	10	2.3 \pm 2.4 a	3	10.8 \pm 1.4 b	3	20.0 \pm 1.9 c	6	35.3 \pm 4.6 d
volatile compounds (mg of N/100 g of flesh)								
TVB-N	12	11.9 \pm 2.7		na ^c		na	8	12.7 \pm 3.2
TMA-N	12	<0.7 ^d		na		na	8	<0.7 ^d
TMAO-N	12	2.9 \pm 2.1		na		na	8	4.0 \pm 3.2
biogenic amines (mg/kg of flesh)	6	<1.1 ^d		na		na	6	<1.1 ^d
free amino acids (g/100 g of flesh)								
histidine	4	0.04 \pm 0.01		na	3	0.03 \pm 0.01	3	0.04 \pm 0.00
lysine	4	0.02 \pm 0.01		na	3	0.01 \pm 0.01	3	0.01 \pm 0.00
arginine	4	0.01 \pm 0.00		na	3	0.01 \pm 0.00	3	0.01 \pm 0.00
other FAA	4	0.26 \pm 0.02		na	3	0.26 \pm 0.01	3	0.23 \pm 0.01
ΣFAA	4	0.34 \pm 0.05		na	3	0.31 \pm 0.03	3	0.30 \pm 0.02

^a Fish samples analyzed. ^b SD, standard deviation. In each row, values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). ^c Not analyzed. ^d Detection limit.

Nucleotide Degradation and K_i Value. The changes of nucleotide amounts and degradation products are shown in **Table 5**. The differences reported were mainly due to the effect of storage time (ANOVA two-way), and therefore the mean values of the three experiments are presented. Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) were not detected, and this result is related to the rapid post-mortem dephosphorylation and deamination of adenine nucleotides throughout inosine monophosphate (IMP) by autolytic process (1, 6).

The initial IMP content was in the range of 6–13 μ mol/g reported for several wild and farmed fish species (7, 24–26). Lower initial IMP values (1.0–4.0 μ mol/g) were reported for wild flatfish species from the Gulf of Alaska (27). The high variability for initial nucleotide contents is associated with differences among species, catching gear, stress during fish death, water temperature, and the time elapsed between catch/slaughter and storage (1, 6).

During the chilled storage, the IMP levels of Senegalese sole progressively decreased, attaining significantly lower contents

Table 6. Quality Criteria Proposed for Whole Raw Chilled Farmed Senegalese Sole

quality grade	criteria	
	quality index ^a (0–22 dp)	K _i value ^b (%)
very fresh	≤3	≤5
fresh	4–7	≤12
acceptable	8–14	
borderline	15–18	
unacceptable	>19	>40

^a Demerit points. ^b K_i value (%) = {[Ino] + [Hx]} × 100 / {[IMP] + [Ino] + [Hx]}.

when the fish was already sensory rejected (16–17 days, **Table 5**). A significant production of the IMP breakdown products, inosine (Ino) and hypoxanthine (Hx), was reported during the storage, and values around 1.0 μmol/g of flesh were reported for both compounds at the end of the storage period. Slightly lower Hx values were found by other authors, for iced farmed and wild sea bass and sea bream, at the limit of sensory acceptability, but higher amounts of Ino (around 3.0 μmol/g flesh) were reported (7, 25).

The rate of nucleotide degradation is usually shown by the K value (%) = {[Ino] + [Hx]} × 100 / {[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [Ino] + [Hx]} (28) because it reflects the formation of Hx and Ino and the decrease of the nucleotide levels, giving in general a good freshness indicator. However, other ratios such as K_i, G, P, H, and Fr have been also used (7, 25) due to their good correlation with fish freshness. In the present work K_i, H, and Fr ratios were calculated because ATP, ADP, and AMP were not detected, but the evolution of the K_i index (%) = {[Ino] + [Hx]} × 100 / {[IMP] + [Ino] + [Hx]} (29) was the most reliable. In fact, despite the variability in the initial values (**Table 5**), mainly due to the variability of Hx levels, the K_i index significantly increased during the entire storage period ($r^2 = 0.9597$, $r = 0.9796$, $p < 0.001$, $K_i = 0.4273 + 2.1228 \times \text{days in ice}$), attaining a value around 35% after 16–17 days in ice. Other researchers found analogous initial values for the K index of farmed turbot (21, 22), but much higher values (around 70%) were found for rejected fish, after 19–20 days, and considerable changes were not observed until the end of iced storage (30–40 days). Similar K_i and K values (close to 80%) were also reported for unacceptable wild turbot, after 15 days of iced storage (19). Values in the range of 60–100% were obtained for some wild flatfish species and wild ground and pelagic fish, after 7 and 15 days of ice storage, respectively (27, 24). These results suggests a slow degradation from IMP to Hx [mainly due to microbial action (1, 6)] during the edible period of iced Senegalese sole stored at temperatures below 3 °C.

The evolution of the K_i index follows the loss of freshness, as evidenced by the significant correlations between this index and sensory data ($r = -0.9638$, $p = 0.0005$; $r = 0.9883$, $p = 0.00003$, respectively, for odor/flavor and QI). In particular, both QI and K_i values significantly increased after 4, 9, and 16–17 days (**Figure 3**; **Table 5**), which allows the proposal of some freshness/quality criteria present in **Table 6**.

Volatile Nitrogen Compounds (TVB-N/TMA-N). TVB-N and especially TMA-N are associated with seafood spoilage, and in general they are considered unreliable for the measurement of spoilage during the first 10 days of chilled storage of several fish species (1, 6). The determination of these compounds at the time of sensory rejection appears to be adequate to evaluate the spoilage level of fish. In the present work,

significant formation of these volatile compounds was not observed (**Table 5**). In particular, the nonformation of TMA-N [which is a result of the bacterial reduction of TMAO (1, 6)] is corroborated with the constancy of TMAO-N values (**Table 5**) and with sensory assessment, because the panel did not perceive the typical fishy odor (associated with high TMA-N levels of spoiled fish) in any of the three experiments. Levels around 10–15 mg of TMA-N/100 g of flesh were used as the limit for fresh fish aerobically stored (30), and the TVB-N limits were fixed in the range of 25–35 mg of N/100 g for some fish species (31); in particular, the limit of 30 mg of N/100 g of flesh was established for the Pleuronectidae family [with the exception of halibut (*Hippoglossus* spp.)].

These results suggest a limited spoilage of farmed Senegalese sole during a period of 17 days in ice, at appropriate conditions, and are in accordance with others obtained for farmed turbot, in which significant TVB-N/TMA-N formation was not observed within the sensory acceptable period, and even after 40 days in ice the TMA-N contents were below 4 mg/100 g (20, 22). The same pattern was found for other farmed species such as sea bass (32).

In further experiments, it will be interesting to evaluate if the limited spoilage of Senegalese sole is due to the low levels of TMAO in its flesh [values of 38–64 mgN/100 g of flesh were found for turbot and lemon sole (33)] or to the presence of specific spoilage bacteria other than *Shewanella putrefaciens*, which is associated with the reduction of TMAO to TMA in marine fish species (34) or a combination of both factors.

Free Amino Acids (FAA). Low amounts of FAA were reported (**Table 5**); in particular, the precursors of biogenic amines, such as lysine, histidine, and arginine, were below 0.05 g/100 g of flesh over the storage period.

Biogenic Amines. These chemical compounds are the result of the decarboxylation of FAA, mainly through decarboxylase enzymes of bacterial origin (1, 35). Like TVB-N and TMA-N, the formation of biogenic amines is measurable mainly during the later stages of chilled storage and is usually used as a seafood quality indicator (1, 35). In this work their levels were below the detection limit (**Table 5**), probably due to the low amounts of FAA. Another reason could be the bacteria profile of Senegalese sole (which was not studied in the present work). Other researchers reported the production of biogenic amines during the chilled storage of wild turbot and farmed sea bass (19, 36). In the former, concentrations of 19 and 14 mg/100 g were reported, respectively, for Put and Cad, at the limit of acceptability (15 days), whereas lower values (3 mg/100 g for Put and 6 mg/100 g for Cad) were found for unacceptable sea bass (15–16 days in ice).

In conclusion, a shelf life of 15 days was defined for whole raw farmed Senegalese sole stored in ice at proper conditions (up to 3 °C). The optimized QIM scheme contains a total of 22 demerit points and several quality parameters to discriminate the freshness of this species and to predict its remaining shelf life in ice. The K_i value significantly correlated with sensory data and appears to be a useful chemical freshness indicator of iced Senegalese sole. Periods longer than 16–17 days seem to be needed for the spoilage of this species. Further studies should be done for a better comprehension of the spoilage pattern of this species during the chilled storage and to validate the results obtained in this work.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the farms Aqualvor (Algarve, Portugal) and Rio Alto (Viana do Castelo, Portugal) for the supply of Senegalese sole. We thank Manuel Pires, Helena Silva, Rogério Mendes, Irineu Batista, and Leonor Nunes for their availability for sensory assessment and also Bárbara Fonseca for her technical assistance on the chemical analyses.

LITERATURE CITED

- (1) Huss, H. H. *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*; FAO Fishery Technical Paper 348; FAO: Rome, Italy, 1995; 195 pp.
- (2) Council Regulation (EC) 2406/96. Common marketing standards for certain fishery products. *Off. J. Eur. Communities* **1996**, *L 334*, 1–15.
- (3) Bremner, H. A.; Olley, J.; Vail, A. M. A. Estimating time–temperature effects by a rapid systematic sensory method. In *Seafood Quality Determination, Developments in Food Science*; Kramer, D. E., Liston, J., Eds.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1987; Vol. 15, pp 413–435.
- (4) Barbosa, A.; Vaz-Pires, P. Quality index method (QIM): development of a sensorial scheme for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Control* **2004**, *15*, 161–168.
- (5) QIMEUROFISH. QIM—your ideal tool for quality determination of fish freshness; available at <http://www.qim-eurofish.com/index7/index.htm>, accessed Sept 2006.
- (6) Ólafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I. M.; Henehan, G.; Nielsen, J.; Nielsen, H. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* **1997**, *8*, 258–265.
- (7) Alasalvar, C.; Taylor, K. D. A.; Öksüz, A.; Shahidi, F.; Alexis, M. Comparison of freshness quality of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 3220–3226.
- (8) AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., 4th rev.; Association of Official Analytical Chemists International: Gaithersburg, MD, 1998; CD-ROM.
- (9) Cobb, B. F., III; Alaniz, I.; Thompson Jr., C. A. Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 431–436.
- (10) Veciana-Nogues, M. T.; Hernandez-Jover, T.; Marine-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 1045–1050.
- (11) Ryder, J. M. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 678–680.
- (12) Gras, J.; Gudefin, Y.; Chagny, F. Free amino acids and ninhydrin-positive substances in fish: I. Muscle and skin of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.* **1978**, *60B*, 369–372.
- (13) Howgate, P. *Approaches to the Definition and Measurement of Storage Life of Chilled and Frozen Fish*; Torry Research Station: Aberdeen, U.K., 1985; 12 pp.
- (14) Zar, J. H. Comparing simple linear regression equations. In *Biostatistical Analysis*, 4th ed.; Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1999; pp 360–376.
- (15) Lie, Ø. Flesh quality—the role of nutrition. *Aquac. Res.* **2001**, *32*, 341–348.
- (16) Regost, C.; Arzel, J.; Cardinal, M.; Robin, J.; Laroche, M.; Kaushik, S. J. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* **2001**, *193*, 291–309.
- (17) Fountoulaki, E.; Alexis, M. N.; Nengas, I.; Venou, B. Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* **2003**, *225*, 309–323.
- (18) Ruff, N.; Fitzgerald, R. D.; Cross, T. F.; Kerry, J. P. Comparative composition and shelf life of fillets of wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquac. Int.* **2002**, *10*, 241–256.
- (19) Özogul, Y.; Özogul, F.; Kuley, E.; Özkutuk, A. S.; Gökbulut, C.; Köse, S. Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the black sea, during chilled storage. *Food Chem.* **2006**, *99*, 752–758.
- (20) Rodríguez, Ó.; Barros-Velázquez, J.; Ojea, C.; Piñeiro, C.; Aubourg, S. P. Evaluation of sensory and microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2764–2771.
- (21) Aubourg, S. P.; Piñeiro, C.; Gallardo, J. M.; Barros-Velázquez, J. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.* **2005**, *90*, 445–452.
- (22) Rodríguez, Ó.; Barros-Velázquez, J.; Piñeiro, C.; Gallardo, J. M.; Aubourg, S. P. Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.* **2006**, *95*, 270–278.
- (23) Zar, J. H. Simple linear regression equations. In *Biostatistical Analysis*, 4th ed.; Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1999; pp 324–359.
- (24) Gonçalves, A.; Pereira, T.; Bettencourt, F.; Nunes, M. L.; Quinta, R. Nucleotide degradation as an indicator of freshness in groundfish and small pelagic fish species. In *Methods To Determine the Freshness of Fish in Research and Industry*; Olafsdóttir, G., Luten, J., Dalgaard, P., Careche, M., Verrez-Bagnis, V., Martinsdóttir, E., Heia, K., Eds.; International Institute of Refrigeration: Paris, France, 1997; pp 273–276.
- (25) Alasalvar, C.; Taylor, K. D.; Shahidi, F. Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2039–2045.
- (26) Grigorakis, K.; Alexis, M.; Gialamas, I.; Nikolopoulou, D. Sensory, microbiological and chemical spoilage of cultured common sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice: a seasonal differentiation. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 584–587.
- (27) Greene, D. H.; Babbitt, J. K.; Reppond, K. D. Patterns of nucleotide catabolism as freshness indicators in flatfish from Gulf of Alaska. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1236–1238.
- (28) Saito, T.; Arai, K. I.; Matsuyoshi, M. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1959**, *24*, 749–750.
- (29) Karube, I.; Matsuoka, H.; Suzuki, S.; Watanabe, E.; Toyama, K. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 314–319.
- (30) Connell, J. J. Methods of assessing and selecting for quality. In *Control of Fish Quality*; Fishing News (Books): Surrey, U.K., 1975; pp 107–132.
- (31) Commission Decision 95/149/EC. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Off. J. Eur. Communities* **1995**, *L 097*, 84–87.
- (32) Castro, P.; Padrón, J. C. P.; Cansino, M. J. C.; Velázquez, E. S.; Larriva, R. M. Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* **2006**, *17*, 245–248.
- (33) Oehlenschläger, J. Volatile amines as freshness/spoilage indicators. A literature review. In *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Developments in Food Science*; Luten, J. B., Børresen, T., Liston, J., Oehlenschläger, J., Eds.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1997; Vol. 38, pp 571–586.
- (34) Gram, L.; Huss, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *33*, 121–137.

- (35) Rawles, D. D.; Flick, G. J.; Martin, R. E. Biogenic amines in fish and shellfish. *Adv. Food Nut. Res.* **1996**, *39*, 329–365.
- (36) Paleologos, E. K.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. Biogenic amines formation and its relation to microbial and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 549–557.

Received for review November 4, 2006. Revised manuscript received March 1, 2007. Accepted March 2, 2007. This work was financially supported by EU-QCA III-MARE/FEDER: Project “Quality and Innovation of Fishery Products”.

JF0632942

**FRESHNESS AND SHELF LIFE OF ICED FARMED SEA BREAM
(*Sparus aurata*) AS INFLUENCED BY CULTURE SYSTEM**

Submission
Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Manuscript ID: jf-2009-04502c

Title: Freshness and shelf life of iced farmed sea bream (*Sparus aurata*) as influenced by culture system

Authors: Gonçalves, Amparo
Duarte, Aida
Nunes, Ma Leonor

Date Submitted: 21-Dec-2009

Freshness and shelf life of iced farmed sea bream (*Sparus aurata*) as influenced by culture system

Amparo Gonçalves^{1*}, *Bárbara Fonseca*¹, *Cândida Borges*¹, *Mónica McGill*¹, *Aida Duarte*²
and *Maria Leonor Nunes*¹

¹ Upgrading of Fishery and Aquaculture Products Research Unity, National Institute of Biological Resources – INRB, I.P./L-IPIMAR, Avenida Brasília, 1449-006 Lisboa-Portugal

² Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Avenida Prof. Gama Pinto, 1649-019 Lisboa-Portugal

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +351 213027036. Fax: +351 213015948

E-mail: amparo@ipimar.pt

Freshness and Shelf Life of Farmed Sea Bream

ABSTRACT. Gilthead sea bream is an economically important fish species in many southern European countries and is generally marketed whole, stored in ice. Two main objectives were considered in this study: 1) to evaluate the influence of culture system on the freshness and the shelf life in ice and 2) to carry out a critical analysis of the results with published data in order to propose quality criteria for this species. Thus, the quality of sea bream reared under intensive and semi-intensive conditions was assessed, by sensory and chemical methods, during the chill storage. Freshness and quality changes were not significantly influenced by culture system and a shelf life of 14 days was estimated, when Quality Index (QI) attained an average value of 14 ± 1 demerit points (dp). The results allow to propose the following quality criteria: $QI \leq 8$ dp and $K_i \leq 20$ % correspond to a fresh fish whereas $QI \geq 14$ dp and $K_i > 40$ % indicate borderline quality of iced farmed sea bream.

KEYWORDS (Word Style “BG_Keywords”). Freshness, Shelf life, Sensory evaluation, Quality Index Method, K value, Gilthead sea bream, Farmed fish

INTRODUCTION

Currently, aquaculture contributes to approximately 50 % of the fish products consumed by the human population worldwide, which is generally distributed as live or fresh (1). The storage in ice at 2 – 4 °C is the method commonly used to keep wet fish, providing the fish is held at the temperature of melting ice (0 °C), which contributes to the off-flavors and off-odors wash out (2). The pattern of fish deterioration is specific for each species and depends on several factors including production/capture methods, *post mortem* handling and storage conditions (2). In respect of farmed fish, the culture conditions are also of major significance, particularly rearing density, pre-slaughter practices and slaughter methods, due to their potential effect on the animal welfare and stress (3, 4, 5). The stress of fish could affect the muscle characteristics, namely the onset and resolution of *rigor mortis* which affect the freshness and consequently the shelf life, defined as the time that the fish can be stored and remain acceptable for human consumption (6). Despite the amount of published data about the influence of culture conditions on the quality of farmed fish, mainly on chemical composition and nutritional value (7), few studies have been carried out about the effect of culture conditions on the freshness of farmed fish and whether they influence the quality changes taking place during the chill storage.

Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is an economically important fish species in many southern European countries, being within the top five farmed species produced in the EU (71232 tonnes in 2006) (8). The first EU producer is Greece, followed by Spain and Cyprus. In Portugal sea bream production represents the second major species regarding the total aquaculture production (1605 tonnes in 2006) (8), mostly produced in semi-intensive systems (earthen ponds), as in the south Spain, with low rearing densities (0.5 - 5 kg/m³). However, in several EU other countries intensive systems, like cages and tanks, which are associated to high intensification of fish density, up to 60 kg/m³, are quite used. Gilthead sea bream is very much appreciated and as for other cultured species is usually marketed as whole fish, stored in ice. At present, extensive and semi-intensive farming systems are facing difficulties, particularly due to the lowest price of products from intensive aquaculture. There is a current opinion related to the possibility of differentiation of fish produced by extensive or semi-intensive systems from intensive produced fish, through quality markers (9). Among quality attributes, freshness is of major relevance, in particular

the external appearance of raw fish, because it influences the consumer acceptability and thus determines the price and marketability of fish (2, 6). Several works have been published about the influence of culture conditions, namely rearing densities, photoperiod, feed composition and starvation period on the external appearance, sensory properties and some of them focused on the freshness of farmed sea bream (10 - 12). The results have shown differences mainly in the body morphology and skin pigmentation with no influence on the freshness. However, sensory assessment is the most important tool to assess the fish freshness and the sensory methods used are of major relevance.

Quality Index Method (QIM) has been considered the most objective and reliable sensory method to evaluate the freshness of fish during the chill storage (6, 13, 14). This method is developed specifically for each species, based on well defined changes of sensory attributes, during the storage time. Each attribute is described by a maximum of four descriptors, scored from zero, for the highest freshness, to a maximum of 3 demerit points (dp), for the lower quality. The sum of all scores gives an overall score, which is the quality index (QI) (6, 14). Thus, the theoretical evolution of QI initiates at low values (close to zero) and increases during the storage to achieving the maximum when the fish should be rejected.

Relevant studies focused on the freshness and shelf life of iced farmed sea bream using QIM schemes, covering a wide range of culture systems and slaughter practices were also published (15 – 25), but differences in the results were observed. Large post-harvest losses still occur over the supply chain mainly due to inadequate handling and storage conditions, but the lacking of adequate quality criteria also contribute to this process (1). Guaranteeing the quality of aquaculture products is crucial to improve the confidence of consumers, to enhance a better image of aquaculture sector and its competitiveness (26). Thus, the purpose of the present study was to evaluate the influence of intensive/semi-intensive rearing conditions on the freshness evolution of farmed gilthead sea bream during the chill storage and to carry out a critical analysis of the results in order to estimate the most reliable shelf life in ice and to propose quality criteria for this species.

MATERIALS AND METHODS

Fish source. Six different batches of commercial size farmed sea bream, cultivated under different rearing conditions, were obtained from five fish farms, in different periods (**Table 1**). As usual, in each farm the fish were slaughtered by immersion in a ice:water slurry, after a fasting period of at least 24 hours. After death, fish were packed in expanded polystyrene

boxes, covered by a thin plastic film, with crushed ice on the top and transported to the laboratory. Mean weight of fish was determined at each fish farm and is presented in **Table 1**.

Storage Experiments and Sampling. The reception of fish in the laboratory occurred within 1 day after slaughter, except in the case of batch IJ (fish cultured in cages), which took place after 3 days. Fish were then conditioned in polypropylene boxes with perforated bottom, covered by a thin plastic film with crushed ice on top. The boxes were stored under refrigerated conditions at 2.3 ± 1.2 °C and the ice was replenished as necessary. During the chill storage samples were regularly taken for freshness evaluation by sensory assessment and chemical analysis (Table 1). Samples for proximate composition were taken only at the reception day (initial). Sampling for microbial analyses was carried out only on batches IT2 and SI3 at initial (1 day in ice) and on the day of sensory rejection.

Table 1. Culture conditions, body weight and sampling of farmed sea bream used in the study.

Culture system	Rearing conditions	Batches	Season	Weight (g)	Sampling days*
Intensive	Tanks	IT1	Spring	356.3±55.0	1, 3, 4, 7, 9, 11, 14
		IT2	Autumn	526.4±76,8	<u>1</u>, <u>3</u>, <u>6</u>, <u>8</u>, <u>10</u>, <u>13</u>
	Cages	IJ	Winter	446.0±59.4	<u>3</u>, <u>6</u>, <u>9</u>, 11, <u>13</u>
Semi-intensive	Earthen ponds	SI1	Spring	380.0±40.3	1, 3, 7, 10, 14
		SI2	Spring	393.4±57.6	1, 3, 7, 10, 14
		SI3	Winter	400.9±40.5	<u>1</u>, <u>3</u>, <u>6</u>, <u>8</u>, <u>10</u>, <u>13</u>

* Days in bold and underline correspond to sampling for TVB-N/TMA-N and nucleotide analysis, respectively.

Sensory Evaluation. Sensory evaluation took place in a room with air conditioning and individual booths, equipped with water and normal white light. The sensory panel was composed by four trained assessors. Four fish per batch were assessed in each sampling day.

The freshness of raw fish was evaluated using the QIM scheme developed for farmed whole gilthead sea bream (15) after slightly modifications. The attributes evaluated were: skin appearance (brightness), body stiffness (assessed by pressing a finger on the spine muscle), eyes (shape, clarity of cornea and color of pupil) and gills (color and odor). A maximum of 2 dp was assigned, except in the case of skin appearance and gills odor, which were scored with a maximum of 3 dp. Thus, QI totalize 16 dp. Each panelist assessed one fish (whole raw).

After the raw assessment, the fish were gutted, headed and filleted. One of the fillets was used for chemical analyses and the other was prepared for cooking. Each fillet (only the main dorsal part) was wrapped with perforated aluminum foil and cooked for 8-10 min at 100 °C in a saturated steam oven (Rational Combi-Master CM6 Cross Kuchentechnik CmbH, Landsberg a. Lech, Germany). Cooked fillets were presented to the assessors in white coded dishes. The odor and flavor of fillets were assessed using the Torry scale (6, 27), which scores range from 10 to 3: 10 - very fresh fish, with weak odor/sweet characteristic flavor; 7- less characteristic odor/flavor; 6 - neutral odor/insipid; 5 - slightly sour/rancid odor, trace of "off-flavors"; 3 - strong sour/rancid/bitter odor and flavor (putrid or spoiled fish). Average score of odor and flavor of 5.0 was adopted as a limit of sensory acceptability.

Chemical Analyses. All chemical analyses were done on minced fish muscle, without skin. For proximate composition, both fillets of three up to six fish were used to constitute the samples. During the chill storage, one fillet from each fish (collected after the sensory raw assessment) was minced to constitute a sample for chemical analyses: four samples per batch were used in each sampling day.

Proximate composition. Ash, moisture, crude protein and fat contents were determined by the reference methods, described in AOAC (28). Ash was determined by incineration of fish muscle (previously dried) in a furnace at 500 ± 25 °C until to constant weight (Method 942.05). Moisture was determined by the air drying method, during 12-16 hours at 105 ± 2 °C in air oven (Method 950.46). Crude protein was determined by Kjeldahl method and the percentage of protein was calculated as total nitrogen x 6.25 (Method 981.10). Fat was extracted with diethyl ether solvent in a soxhlet apparatus (Method 991.36). Sample was refluxed during 7 hours at adjusted temperature. Fat was determined by weight after drying to constant weight in a 105 ± 2 °C air oven.

Total volatile bases nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N). Volatile basic compounds were determined in fish muscle extracts prepared with 10 % trichloroacetic acid (1:2 m/v) by the microdiffusion method (29). For TMA-N determination, 40 % (v/v) formaldehyde was previously added to the extract (1:1 v/v) to lock the primary and secondary amines. Results were expressed as mg N/100 g of muscle.

Nucleotides and nucleotide catabolites. Extracts were prepared from 5 g of fish mince homogenized with 25 ml 0.6 M perchloric acid, followed by centrifugation at 3000 g, during 10 min at 0 °C and pH adjustment (to 6.5 – 6.8, with KOH 1M). The separation of nucleotides was done by HPLC in a Agilent 1100 Series LC Systems, as described by (30) on a reverse phase column (Lichrosorb 100 RP-18 10µm, 250 x 4.6 mm). Phosphate buffer (0.1 M, pH=6.95) composed the mobile phase, elution was isocratic (flow rate=1.6 ml/min.) and detection was done at 254 nm. Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), inosine monophosphate (IMP), inosine (Ino) and hypoxanthine (Hx) were identified and quantified by comparison with standards (Sigma) through calibration curves, using the Agilent ChemStation software G2170AA (Agilent Technologies, USA). Results were expressed as µmol/g muscle.

Microbiological analyses. A composite sample of 20 g of fish muscle collected from three fish was diluted in nine fold in tryptone salt solution (0.85 %) and blended in a Stomacher 400 (Seward, London, UK) during 1 min. Adequate serial dilutions were prepared for total viable counts (TVC). The inoculum was spread plate on Plate count agar (PCA, Oxoid Ltd., Hampshire, UK) and plates were incubated at 20 °C for 5-6 days. Inoculations were performed in duplicate. Results were expressed as colony forming units (cfu/g).

Statistical Analysis. The statistical treatment of the results was performed using Software Statistica, vers. 6.1 (Stat Soft, Inc., Tulsa, Ok 74104, USA). Differences in the proximate composition between batches were tested through an analysis of variance followed by Tukey Multicomparison Test. A time-dependent linear regression analysis was performed for the evolution of QI, odor/flavor and K_i index. Differences in the quality changes between fish groups were tested through the comparison of the regression equations. Correlations between sensory and chemical data were also done. Significance was tested at $\alpha=0.05$ ($p<0.05$) (31).

RESULTS AND DISCUSSION

Significant differences between the six independent batches of sea bream were detected in particular for moisture and fat contents (**Table 2**). Fat contents found in the present work were within the range 2.5 – 11.1 % reported for the flesh of farmed sea bream (7). The content of protein was close to 20 % which is within the usual variety of 18 – 22 % found for farmed or wild fish (7, 32).

Table 2. Proximate composition of raw farmed sea bream reared in different conditions.

Culture system	g/100 g muscle, wet weight			
	Moisture	Fat	Protein	Ash
IT1	73.5±0.7 ^c	5.7±1.4 ^a	19.8±0.7 ^{ab}	1.28±0.09 ^a
IT2	67.1±1.3 ^a	11.0±1.2 ^b	20.2±0.2 ^b	1.40±0.00 ^b
IJ	69.5±0.8 ^b	9.0±0.5 ^b	19.4±0.3 ^a	1.37±0.05 ^{ab}
SI1	73.6±0.6 ^c	5.4±1.2 ^a	19.7±0.5 ^{ab}	1.34±0.05 ^{ab}
SI2	73.5±0.5 ^c	5.0±0.5 ^a	20.0±0.2 ^{ab}	1.32±0.07 ^{ab}
SI3	68.1±0.8 ^{ab}	9.4±0.9 ^b	20.4±0.2 ^b	1.38±0.04 ^{ab}

Values are the mean ±standard deviation (N = 4 fish analyzed). Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05). IT1, IT2: tanks; IJ: cages; SI1, SI2, SI3: Ponds.

The differences found in the fat levels seem to be not related with rearing density as the highest levels were found for both intensively reared fish such as batches IT2 and IJ as well as for batch SI3, cultured in ponds (semi-intensive production). Furthermore, batches SI1, SI2 and IT1 presented similar fat content. In fact, the muscle composition of farmed fish, particularly the fat content and fatty acid composition, is mostly related with feed composition and feeding strategies than with other culture conditions (7, 32, 33).

Sensory assessment is of major importance in shelf life studies of food products. In this subject, the most important questions to be answered are: how long the product maintains acceptable sensory quality (shelf life) and how the products quality change with storage time (6). The appearance of raw fish, together with the odor and flavor are the best sensory attributes that reflect the freshness of fish. Thus, in shelf life studies it is usual the

assessment of these attributes to evaluate the loss of fish freshness. In particular, the assessment of odor and flavor of cooked fish is used to estimate the shelf life of fish – ESL (6, 14, 27). Typically, the changes in both attributes followed a similar evolution during the chill storage and the results found in this study corroborate such observation and a positive linear correlation between both attributes was found in all batches of sea bream ($0.8405 \leq r^2 \leq 0.9581$, $0.9168 \leq r \leq 0.9788$; $0.000004 \leq p \leq 0.0285$). Thus, **Figure 1** shows the evolution of the odor and flavor average scores during the chill storage; significant linearity was observed for the six batches. The high scores reported at initial (9 - 10 points) reflect the high freshness of sea bream cultured in the different systems.

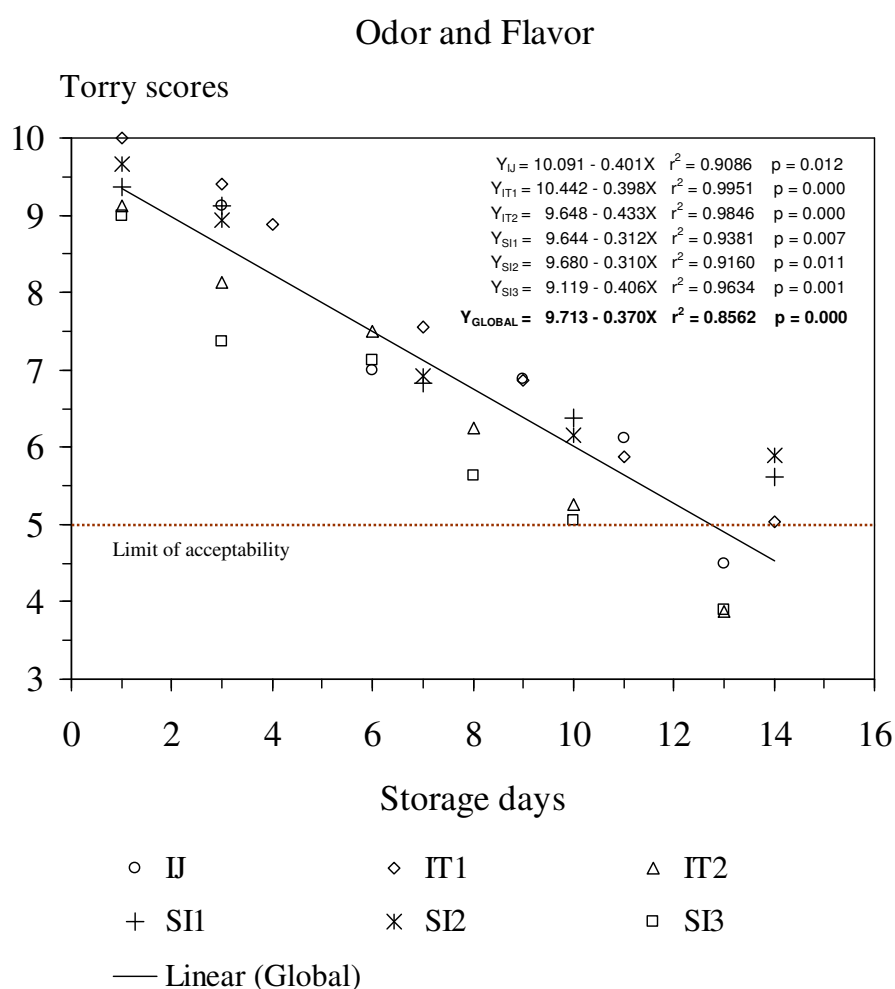


Figure 1. Evolution of the odor and flavor (average scores) of farmed sea bream during the chill storage at 2.3 ± 1.2 °C. Each data point is the mean value of 4 fish assessed ($0.0 \leq$ standard deviation ≤ 1.5). Score 10 – weak odor/sweet characteristic flavour (high freshness); score 6 – neutral odor/insipid; score 5 - slightly sour/ rancid odor, trace of “off-flavors”; score 3 – strong sour, slightly sulphide, rancid, bitter odor and flavor. Sea bream reared in cages (IJ), tanks (IT1, IT2) and ponds (SI1, SI2, SI3).

On the 3rd day only the batches IT2 and SI3, produced in intensive and semi-intensive systems, respectively, were classified with lower scores than the other four batches which were more similar. Therefore, it seems that the differences were not related with rearing conditions, but instead with the usual variability among the fish. On days 10 and 11 of storage, only the batches IT2 and SI3 were scored very close to the limit of acceptability (5.3 and 5.1, respectively) while the other fish achieved slightly higher scores (5.9 – 6.1). On day 13, the batches IT2, SI3 and IJ were scored below the limit (scores of 3.9 and 4.5 for IT2/SI and J, respectively) whereas on day 14 the batches SI1 and SI2 were scored above the limit of acceptability (5.6 and 5.9, respectively), but batch IT1 was scored just on the borderline (**Figure 1**). These differences could be related with the highest fat contents reported for batches considered unacceptable or at borderline quality (**Table 2**). Nevertheless, significant differences among the slopes of the six linear regressions were not found, which means that the weak odor/sweet flavor, characteristic of fresh fish, was gradually decreasing over the storage period in a similar rate in all fish batches. As a result, the global regression (considering all data) significantly correlated with storage time, allowing explaining the odor and flavor changes of sea bream stored in ice. Based on these changes it can be said that farmed sea bream maintain acceptable sensory quality up to 13 – 14 days of chill storage, irrespective the rearing conditions. This result is consistent with the shelf life in ice of 8 to 12 days reported for fish species, properly handled at appropriate temperature (2). In the case of iced sea bream, cooked fish became unacceptable after a period from 12 – 13 days (19, 21) up to 14 – 15 days (15, 18, 21, 24, 25). Other studies have shown sensory acceptability of iced sea bream during 16 – 18 days (16, 20, 23) or even 20 days (17).

The estimation of shelf life based on sensory criterion is usually accepted because the changes due to bacterial spoilage occur later during the chill storage (2). Nevertheless, microbial criterion is important and the number of specific spoilage organisms (SSO) can be used as objective quality indicator for chilled fish (13, 34). However, given the difficulty to determine the number of SSO, is very common to use the limit of 10^7 cfu/g of TVC, established for raw fish products (35, 36) as microbial criterion to estimate the shelf life of chilled fish. In the present work, the changes in TVC were evaluated only in two batches, representing intensive and semi-intensive production systems (groups IT2 and SI3, respectively). Significant differences in the initial counts were not found and mean values of 5.2 ± 0.2 and 6.1 ± 0.1 log cfu/g were reported for SI3 and IT2, respectively. These values correspond to counts in the order 10^4 - 10^6 cfu/g, which are slightly higher than 10^3 – 10^5

cfu/g found to newly caught sea bream (18, 21, 23, 25). As expected, there was a significant increase in TVC values in both batches, reaching values of $7.0 - 7.8 \pm 0.4$ log cfu/g (counts in the order of 10^7 cfu/g) when the fish were sensory rejected (13th day in ice). TVC values \geq to $10^6 - 10^7$ cfu/g were reported in the limit of sensory acceptability (13 - 16 days) (18, 21, 23, 25) of sea bream stored in ice. Moreover, counts in the range $10^5 - 10^7$ cfu/g of H₂S producing bacteria, associated with the spoilage of iced fish (34) were reported only after a period of 16 - 18 days of chill storage (23).

Taking into account the sensory and microbial results obtained in this study and the above discussion, the most reliable estimated shelf life (ESL) of farmed sea bream stored in ice seems to be 14 days. The outcome of this estimation is related to its application for the validation of QIM schemes (6, 14). The linear relationship of the QI with the storage time permits the prediction of the storage days in ice (PST – predicted storage time) and to estimate the remaining shelf life (RSL = ESL – PST), defined as the time period in which the fish is still acceptable for human consumption (6, 14). Therefore, the validation of the QIM scheme used for sea bream is essential because the goal is to have an accurate, non-invasive, method to evaluate the raw freshness, over the commercial chain, to avoid economical losses. In the present study, significant linear correlations between QI and storage time, were obtained for all batches of sea bream (**Figure 2**). The comparison of linear regressions did not evidence significant differences in the rate of freshness decay among the six fish batches. The global regression also significantly correlated with the storage time, providing a model for the prediction of quality changes of sea bream during the storage in ice. Similar results were found for iced sea bream evaluated with identical QIM schemes, particularly the slopes of linear regressions, which reflect the deterioration rate of fish ($Y = 0.255 + 0.953X$, $r^2 = 0.974$; $Y = 1.243 + 0.850X$, $r^2 = 0.862$) (23, 24). In the latter case the scheme comprises a total of 19 dp, due to the inclusion of two additional parameters (clarity and consistency of mucus in the gills) to the original scheme of 15 dp (15). However, the evolution pattern of mucus attends very well the changes that occur in the color of gills. Thus, both parameters can be used simultaneously to describe the modification in the appearance of gills. As a result, slightly adjustments were introduced in the descriptors of this parameter, which are shown in **Table 3**. Other questionable parameter is the mucus in the skin (slime), considered in the majority of the works compared in the present study. Previously studies showed that this parameter is quite variable and can be misleading, especially when the ice is replenished during the storage period. Therefore, it was excluded of the scheme used in this work.

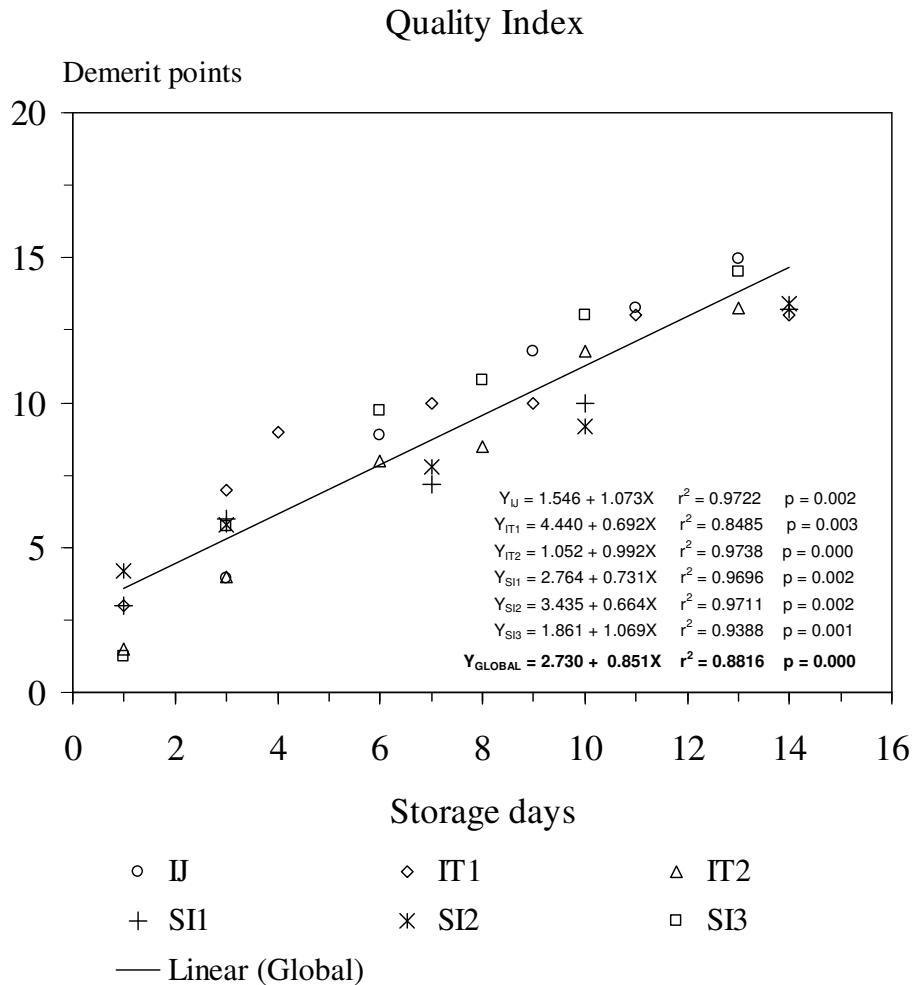


Figure 2. Quality index evolution of whole raw farmed sea bream during the chill storage at 2.3 ± 1.2 °C. Each data point is the mean value of 4 fish assessed ($0.5 \leq$ standard deviation ≤ 1.8). Total demerit points of QIM = 16. Sea bream reared in cages (IJ), tanks (IT1, IT2) and ponds (SII, SI2, SI3).

The changes in QI were significantly correlated with the odor/flavor changes ($r^2 = 0.7781$, $r = -0.8821$, $p = 0.000$). QI values vary within 1 – 4 dp in the first 3 days of chill storage and 9 – 13 dp at days 10 and 11, when the fish clearly loss its fresh condition (average score of odor/flavor was 5.8). The maximum of 13 – 15 dp (average value = 14 ± 1 dp), in a total of 16 dp, was attained at days 13 and 14, when only two batches (SII and SI2) were scored slightly above the limit of acceptability. This difference was mainly related with the parameter skin appearance. In fact, although the evident changes in the skin brightness, the

descriptors need some improvement and the maximum score was changed for 2 dp; consequently the total QI was corrected to 15 dp (**Table 3**).

Table 3. Optimized Quality Index Method (QIM) scheme for the freshness assessment of iced whole raw farmed gilthead sea bream.

Attributes		Descriptors	Demerit points
Skin appearance		Bright, somewhat iridescent	0
		Slightly discoloured, less bright	1
		Dull, pale	2
Body stiffness		Very firm and elastic (pressure signs disappear immediately)	0
		Less firm, elasticity reduced	1
		Soft, plastic (marked by pressure)	2
Eyes	<i>Clarity (cornea)</i>	Clear, translucent	0
		Slightly cloudy	1
		Cloudy, matt	2
	<i>Pupil</i>	Black, bright	0
		Greyish (slightly milky)	1
		White - greyish	2
	<i>Form</i>	Convex	0
		Flat, slightly concave	1
		Concave, sunken, deformed	2
Gills	<i>Appearance</i>	Bright red, no or little transparent mucus, gills lamina perfectly separated.	0
		Slightly discoloured, less bright, slightly clotted mucus	1
		Brownish red discolored, thick/clotted mucus, lamina adhered	2
	<i>Odor</i>	Fresh, neutral or slightly earth odor	0
		Slightly metallic	1
		Musty, sour or slightly fishy	2
		Fishy, sulphurous	3
	Quality Index: 0 – 15 demerit points		

QI values in the range of 12 – 17 dp and 20 – 22 dp were reported for sea bream, at the limit of sensory acceptability, when evaluated by QIM schemes using 15 to 20 dp (15, 17, 18, 23, 24) and 38 dp (16, 20, 25), respectively. It seems clear that the former schemes appear the most optimized and as a result of this critical comparison, a sensory criterion based on QI is proposed in **Table 4**.

Table 4. Quality criteria proposed for whole raw chilled farmed sea bream.

Criteria	Quality grade		
	Very fresh	Fresh	Acceptable
Quality Index (QI) (0 -16 demerit points)	0 – 4	5 – 8	9 – 13
K _i (%)	≤ 6	≤ 20	≤ 40
TVB-N (mg N/100 g muscle)	≤ 20		≤ 30
TMA-N (mg N/100 g muscle)	≤ 1		≤ 4

The prediction of PST and RSL is possible through the following equations:

$$PST = (QI - 2.730)/0.851 \quad \text{and} \quad RSL = ESL (14 \text{ days}) - PST$$

In the case of large lots of fish, the prediction could be done at 95 % confidence level through the association of confidence limits by the following equation 31):

$$X_{Mean} + b(Y_{iMean} - Y_{Mean})/K \pm t/K \sqrt{(S^2_{Y.X})' [(Y_{iMean} - Y_{Mean})^2 / \Sigma x^2 + K(1/m + 1/n)]}$$

Where: X_{Mean} and Y_{Mean} are the mean values of days in ice (X data) and QI (Y data) from the regression model; b is the slope of the regression equation; Y_{iMean} is the mean QI value of m fish assessed; n is the number of data points comprising the regression model; m is the number fish assessed; $t = t_{\alpha(2), (n+m-3)}$ is the critical value of t -Student distribution at α level of significance (usually 0.05) and $(n+m-3)$ degree freedom; $K = b^2 - t^2(S^2_b)'$; $(S^2_b)'$ and $(S^2_{Y.X})'$ are the variances respectively of slope and Y values (residual mean square); Σx^2 is the sum of squared deviations from the X_{Mean} .

As a result the RSL is calculated by the equation: $14 - PSTL_2 \leq RSL \leq 14 - PSTL_1$, where $PSTL_1$ and $PSTL_2$ are the minimum and maximum days in ice estimated, respectively.

Although sensory evaluation is the most important method to assess the freshness of fish, the subjective nature of these methods often requires the adoption of chemical parameters that provide additional information and some studies show significant correlations between sensory and chemical data (13). The *post mortem* nucleotide degradation in fish has been studied by several authors and appears to be coincident with the loss of sensory freshness (37, 38). Since the production of IMP is predominantly autolytic, its concentration may be an indicator of the freshness of some fish species, before the start of bacterial growth. The initial content of nucleotides, mainly ATP, is dependent on several factors, especially nutritional status and the stress that the fish is submitted prior to slaughter. Furthermore, the autolytic dephosphorylation of ATP to IMP occurs very quickly, within 1 to 2 days in most species and at this stage the correct temperature has great influence (37, 38). Thus, in most studies it is only possible to compare the initial levels of IMP as indicators of initial freshness of fish. In this work it was possible to follow the degradation of nucleotides only in three batches (IJ, IT2 and SI3). The levels of ATP, ADP and AMP were generally below the limit of quantification ($0.10 \mu\text{mol/g}$ muscle) and the IMP contents on the first three days of storage ranged between $9 - 15 \pm 2 \mu\text{mol/g}$ muscle, which are in accordance with initial values of $5 - 13 \mu\text{mol/g}$ reported for sea bream, produced under different rearing systems and slaughtered by different methods (16, 19, 20, 22-24). Differences in IMP levels clearly associated to rearing density were not observed in the present work since during the first 10 days of storage there has been greater similarity in IMP contents between groups IJ and SI3 (intensive cage and semi-intensive ponds, respectively) while batch IT2 (intensive tanks rearing) was significantly different from both groups. Although both batches IJ and IT2 represent intensive rearing systems it is possible that the variation in rearing densities, usually verified in different fish farms can justify this difference. But, it is also reasonable to admit the influence of other factors, mainly the physical condition of fish, as a result of the capture and slaughter practices, as they are driving factors of stress and clearly affect the energy use and so the *post-mortem* ATP levels. Furthermore, the handling and storage temperature during transport are important factors because influence the enzymatic dephosphorylation of ATP to IMP (37, 38). There were no significant differences in the concentration of IMP at the time of sensory rejection (13th day of storage) among the three batches, registering an average value of $5 \pm$

1 $\mu\text{mol/g}$, in concordance with those reported for sea bream at the limit of acceptability: 3 – 7 $\mu\text{mol/g}$ (16, 19, 20, 22-24).

The formation of Ino and Hx, as a result of IMP degradation, followed similar pattern in the three batches compared (IJ, IT2 and SI3), thus, identical contents were found at the 13th day of storage, 3 ± 1 and 1 ± 0 $\mu\text{mol/g}$ for Ino and Hx, respectively, in the range 0 - 3 $\mu\text{mol/g}$ reported for iced sea bream at the limit of acceptability (16, 19, 20, 22-24).

The rate of nucleotide degradation is usually represented by the K value because it reflects the formation of Hx and Ino and the decrease of the nucleotide levels, giving in general a good freshness indicator (38). Other indices that do not require the concentration of ATP, ADP or AMP, like K_i (or K_i) have been also used (38), due to its good correlation with fish freshness. In the present work K_i value (%) = $\left\{ \frac{[\text{Ino}] + [\text{Hx}]}{[\text{IMP}] + [\text{Ino}] + [\text{Hx}]} \right\} \times 100$ (39) was calculated and the evolution of this index is presented in **Figure 3**.

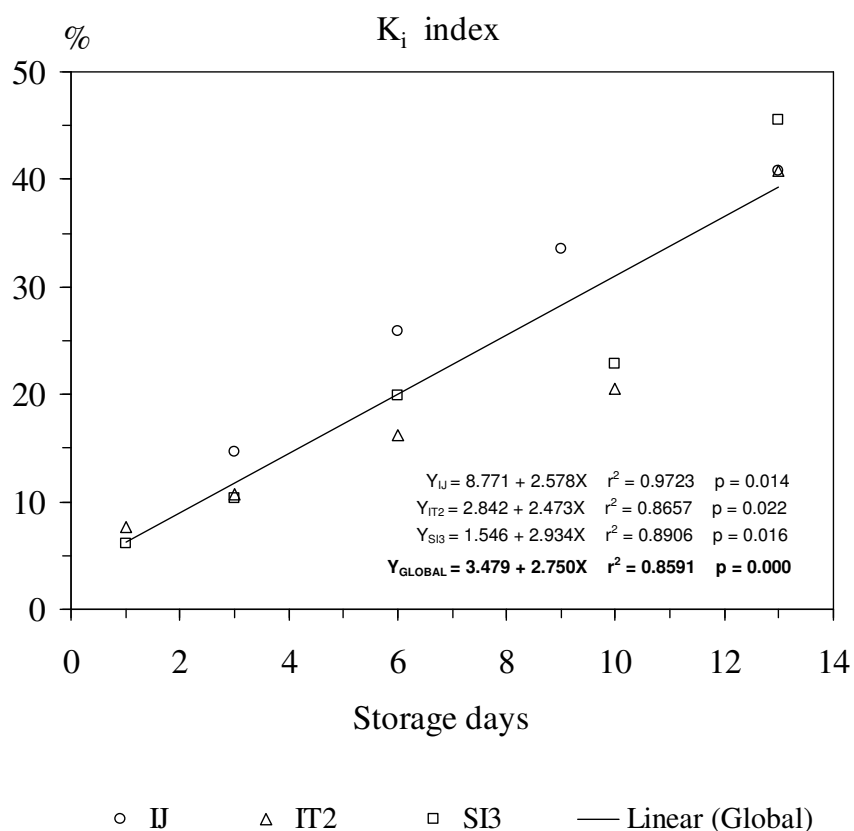


Figure 3. Evolution of K_i index during the chill storage of farmed sea bream at 2.3 ± 1.2 °C. Each data point is the mean value of 4 fish analyzed ($0.2 \leq$ standard deviation ≤ 6.2). Sea bream reared in cages (IJ), tanks (IT2) and ponds (SI3).

Significant linear regressions between the K_i value and storage time were observed and the rate of nucleotide degradation was not significantly different among the three batches (similar slopes). The global linear regression was also significant, explaining the changes in nucleotide catabolism. During the first 10 days of storage K_i values increased gradually from 6 – 8 % (1 day on ice) to 20, 23 and 34 % for batches IT2, SI3 and IJ, respectively. When sea bream achieved the limit of sensory acceptability (13 days on ice) recorded values were 41 % (batches IJ and IT2) and 46 % (batch SI3). An increase from 0 – 5 % (1 day in ice) up to 25 – 60 %, after 14 – 25 days in ice, was observed by other authors (16-20, 23, 24). However, the values recorded in the limit of sensory acceptability (12 - 16 days in ice) were in the range 25 – 40 % or 25 – 35 %, in the specific case of sea bream slaughtered by immersion in ice:water slurry (18, 19, 23, 24), as in the present work.

The increase in K_i values correlated significantly with sensory changes, especially with the raw freshness ($r^2 = 0.7961$, $r = - 0.8922$, $p = 0.000$), demonstrating the usefulness of K_i index as a chemical indicator of freshness for sea bream stored in ice (**Table 4**). Other authors also found significant linear correlations between QI and either K or K_i values, for the same species (20, 23, 24).

Unlike nucleotide catabolism, the formation of TVB-N and TMA-N is slow and in most bony fish species high concentrations occurs only in the later stages of chill storage, as a result of bacterial activity, making these compounds interesting as deterioration indicators (13, 40). Moreover, it seems clear some leaching out of these compounds in fish stored in ice (40), which also contributes to increase the results variability. In the present work significant effect of culture system on the formation of TVB-N was not observed and the values ranged between 10 – 22 mg N/100 g flesh at initial and 19 – 31 mg N/100 g at the limit of sensory acceptability (13 – 14 days). These results evidence a fair formation of this compound during the chill storage which is in accordance with published works. An increase of TVB-N values from 14 – 20 (initial) to 20 – 29 mg N/100 g at the limit of sensory acceptability (14 – 15 days) was reported for iced farmed sea bream (17, 21, 22, 25). Contents above the limit of 35 mg N/100 g (41) were only found after 18 or 25 – 27 days of ice storage (25, 21, respectively).

In respect to the formation of TMA-N, which is a result of the bacterial reduction of trimethylamine oxide (13, 40), levels below 0.7 mg N/100 g were found over the chill storage period, except in the case of batches SI3 and IT2 for which values of 2 and 4 mg N/100 g, respectively, were found on the 13th day. These results are in the range 1 – 4 mg

N/100 g reported for iced sea bream at the limit of sensory acceptability (14 – 15 days) (17, 21, 25).

The content of these volatile basic compounds has been regularly used in fish inspection, mainly the TVB-N (because it includes the ammonia and TMA-N), when the sensory evaluation raises doubts with regard to freshness. The limit 25 – 35 g mg N/100 was established for some fish species in the Council Regulation (EC) 2074/2005 (41). Thus, it is useful the determination of these compounds in species for which a limit is still lacking, as is the case of sea bream. Therefore, a complementary quality criterion was proposed in **Table 4**.

In conclusion, the present study shows that culture system, covering different rearing densities, did not significantly influence the freshness of farmed sea bream or the quality changes during the chill storage. Acceptable sensory quality was preserved during a period of 13 – 14 days in ice and a shelf life of 14 days was estimated. The QIM scheme containing 15 demerit points was validated to discriminate the freshness of this species and to predict its remaining shelf life in ice. Furthermore, the K_i index appears to be a useful freshness indicator for iced sea bream. Significant TVB-N and TMA-N formation was not observed within the sensory acceptable period. The comparison of the results with published data allow to propose some quality criteria, which are of most importance to ensure the maximum freshness of fish through the commercial chain, to meet the actual consumers demand for high quality fish products.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by EU-QCA III-MARE/FEDER: Project “Quality and Innovation of Fishery Products”.

LITERATURE CITED

- (1) FAO. The state of world fisheries and aquaculture, 2008. FAO Fisheries Department, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy; 2009; p 176.
- (2) Huss, H.H. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, N° 348, **1995**, FAO, Rome; p 195.
- (3) Paterson, B.; Goodrich, B.; Frost, S. Controlling the quality of aquacultured food products. *Trends in Food Science and Technology*, **1997**, 8, 253-257.

- (4) Robb, D. The killing of quality: the impact of slaughter procedures on fish flesh. In: Seafoods – quality, technology and nutraceutical applications. Alasalvar, C.; Taylor, T., Eds.; Springer, Berlin, Germany, 2002; pp 7-16.
- (5) Poli, B.M.; Parisi, G.; Scappini, F.; Zampacavallo, G. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, **2005**, 13: 29- 49.
- (6) Martinsdóttir , E.; Schelvis, R.; Hyldig, G.; Sveinsdóttir, K. Sensory evaluation of seafood: general principles and guidelines and methods. In: Fishery products: quality, safety and authenticity, Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, United Kingdom, 2009; pp 411-443.
- (7) Grigorakis, K. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, **2007**, 272, 55 - 75.
- (8) European Commission. Facts and figures on the CFP, edition 2008. Publications of the European Communities; Luxembourg, 2008; p 37.
- (9) Martinez, I. Other principles: analysis of lipids, stable isotopes and trace elements. In: Fishery products: quality, safety and authenticity, Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, United Kingdom, 2009; pp 388-404.
- (10) Flos, R.; Reig, L.; Oca, J.; Ginovart, M. Influence of marketing and different land-based systems on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. *Aquaculture International*, **2002**, 10, 189-206.
- (11) Ginés, R.; Afonso, J.M.; Arguello, A.; Zamorano, M.J.; López, J.L. The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, **2004**, 35, 1207-1212.
- (12) Pinto, J.; Nunes, M.L.; C. Cardoso. Feeding interruption and quality of cultured gilthead sea bream. *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1504-1510.
- (13) Ólafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I.M.; Henehan, G.; Nielsen, J.; Nielsen, H. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, **1997**, 8, 258-265.
- (14) QIM Eurofish. <http://www.qim-eurofish.com/> Accessed 25/11/2009.

- (15) Huidobro, A.; Pastor, A.; Tejada, M. Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, **2000**, *65*, 1202-1205.
- (16) Alasalvar, C.; Taylor, K.D.A.; Öksüz, A.; Garthwait, T.; Alexis, M.N.; Grigorakis, K. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, **2001**, *72*, 33-40.
- (17) Huidobro, A.; Mendes, R.; Nunes, M.L. Slaughtering of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in liquid ice: influence on fish quality. *European Food Research and Technology*, **2001**, *213*, 267-272.
- (18) Huidobro, A.; Pastor, A.; López-Caballero, M.E.; Tejada, M. Washing effect on the quality index method (QIM) developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology*, **2001**, *212*, 408-412.
- (19) Huidobro, A.; Pastor, A.; Tejada, M. Adenosine triphosphate and derivatives as freshness indicators of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Science and Technology International*, **2001**, *7*, 23-30.
- (20) Alasalvar, C.; Taylor, K.D.A.; Shahidi, F. Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, *50*, 2039-2045.
- (21) Tejada, M. and Huidobro, A. Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*, **2002**, *215*, 1-7.
- (22) Grigorakis, K.; Taylor, K.D.A.; Alexis, M.N. Seasonal patterns of spoilage of iced stored cultured Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, **2003**, *81*, 263-268.
- (23) Lougovois, V.P.; Kyranas, E.R.; Kyrana, V.R. Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, **2003**, *36*, 551-560.
- (24) Tejada, M.; Huidobro, A.; Mohamed, F. Evaluation of two quality indices related to ice storage and sensory analysis in farmed gilthead seabream and seabass. *Food Science and Technology International*, **2006**, *12*, 261-268.
- (25) Cakli, S.; Kilinc, B.; Cadun, A.; Dincer, T.; Tolasa, S. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, **2007**, *18*, 391-397.

- (26) European Commission. A strategy for sustainable and prosperous aquaculture. N° 43 April 2009. http://ec.europa.eu/fisheries/publications/magazine_en.htm. Accessed 30/11/2009.
- (27) Howgate, P.F. Quality assessment and quality control. In: Fish Handling & Processing, 2nd edition, Aitken, A.; Mackie, I.M.; Merritt, J.H.; Windsor, M.L. Eds.; Ministry of Agriculture, Fisheries & Food, Torry Research Station: HMSO, Edinburgh, 1982; pp 177 – 186.
- (28) AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Ed., 4th Rev.; Association of Official Analytical Chemists International, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, 1998; CD-ROM.
- (29) Cobb, B.F. III; Alaniz, I.; Thompson Jr, C.A. Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *Journal of Food Science*, **1973**, *38*, 431-436.
- (30) Ryder, J.M. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1985**, *33*, 678-680.
- (31) Zar, J.H. Comparing simple linear regression equations. In: Biostatistical analysis, 4th edition, Prentice-Hall Inc.; Upper Saddle River, New Jersey, 1999; p 663.
- (32) Haard, N.F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, **1992**, *25*, 289 – 307.
- (33) Lie Ø. Flesh quality – the role of nutrition. *Aquaculture Research*, **2001**, *32*, 341-348.
- (34) Gram, L.; Huss, H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **1996**, *33*, 121-137.
- (35) ICMSF. Sampling plans for fish and shellfish. In: Microorganisms in foods, vol. 2, Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies, Eds., 2nd edition, Blackwell Scientific Publications: Oxford, United Kingdom, 1986; pp 181-196.
- (36) IFST. Development and use of microbiological criteria for foods. Institute of Food Science and Technology: London, United Kingdom, 1999; p 79.

- (37) Howgate, P. A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, **2006**, *41*, 341 – 353.
- (38) Tejada, M. ATP-derived products and K-value determination. In: Fishery products: quality, safety and authenticity, Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, United Kingdom, 2009; pp 68-88.
- (39) Karube I.; Matsuoka H.; Suzuki S.; Watanabe E.; Toyama K. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1984**, *32*, 314 - 319.
- (40) Howgate, P. Traditional methods. In: Fishery products: quality, safety and authenticity, Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, United Kingdom, 2009; pp 19-41.
- (41) Commission Regulation (EC) 2074/2005. *OJ*, **2005**, L 338, 27-59.

ARTIGO 3

EFFECT OF OXYGEN ABSORBER ON THE SHELF LIFE OF GILTHEAD SEABREAM (*Sparus aurata*)

Effect of Oxygen Absorber on the Shelf Life of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*)

Amparo Gonçalves
Rogério Mendes
Maria Leonor Nunes

ABSTRACT. The effectiveness of oxygen absorber on the shelf life of scaled and gutted seabream packed in air during 10 days chilled storage (~5°C) was studied. The quality changes were evaluated by sensory, microbial and chemical methods. Absorbers reduced oxygen concentration by 54% within the first two days and levels attained 0.1% after 6 days of storage. Significant differences in K values were not observed between packed batches with and without O₂ absorber. Positive effects of O₂ absorber on the reduction of lipid oxidation and sensory attributes, mainly on the appearance, were observed. [Article copies available for a fee from The Haworth Document Delivery Service: 1-800-HAWORTH. E-mail address: <docdelivery@haworthpress.com> Website: <<http://www.HaworthPress.com>> © 2004 by The Haworth Press, Inc. All rights reserved.]

KEYWORDS. Active packaging, oxygen absorber, gilthead seabream, shelf life

Amparo Gonçalves, MSc, Rogério Mendes, PhD, and Maria Leonor Nunes, PhD, are affiliated with Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas–INIAP/IPIMAR, Av. de Brasília, 1449-006, Lisboa, Portugal.

Address correspondence to: Amparo Gonçalves, MSc, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas–INIAP/IPIMAR, Av. de Brasília, 1449-006, Lisboa, Portugal (E-mail: amparo@ipimar.pt).

The authors wish to thank TIMAR (Portugal) for the kindly supply of gilthead seabream, to Dr. Horácio Cruz and Dra. Teresa Batista for their support and to Dra. Almudena Huidobro (CSIC, Madrid) for the participation in the setting up of this work.

This work was financially supported by EU-QCA III-MARE/FEDER: Project “Quality and Innovation of Fishery Products.”

Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol. 13(3) 2004

<http://www.haworthpress.com/web/JAFPT>

© 2004 by The Haworth Press, Inc. All rights reserved.

Digital Object Identifier: 10.1300/J030v13n03_05

INTRODUCTION

Consumer demand for fresh fish is increasing the importance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) as one of the main fish species farmed in the Mediterranean countries. In Portugal the production of this species has grown in recent years and is mostly marketed iced and ungutted. The seasonal growth in the summer period generates an abundant supply of fresh seabream that has to be commercialized in a short time. Demand for fresh convenient products that offer healthy, tasty and fast meal solutions stresses the need for new ways of marketing gilthead seabream. A good alternative could be a product in a convenient package, scaled and gutted, ready to cook. Active packaging has emerged as a new technological development in the field of food packaging and is used whenever the package requires a function other than providing an inert barrier to external conditions. In this packaging, a wide range of techniques is used in order to extend shelf life and improve safety during the distribution chain (Alvarez, 2000). These include the incorporation of antimicrobial agents and regulators of atmosphere composition inside the packages, as moisture absorbers, carbon dioxide (CO₂) emitters and oxygen (O₂) absorbers.

The O₂ absorber is one of the most widely used active packaging applications. It allows the reduction of oxygen concentration to values lower than 0.01% (Alvarez, 2000), and since it simplifies the process and reduces the costs of equipment, it could be advantageous, compared with modified atmosphere (MA) packaging (including vacuum packaging). O₂ absorbers are composed of chemical substances such as iron, ascorbic acid or enzymes (oxidoreductases), which are able to react with oxygen and present different absorption capacities, up to 2000 cc of O₂ from 10,000 cc of air (Church, 1994). The use of packaging films with low O₂ permeability is recommended in order to minimize the diffusion of O₂ into the package. The choice of absorber depends on the water activity of the product, expected shelf life and oxygen volume inside the package. For solid food products, gas permeable sachets with iron powder are mostly used (Alvarez, 2000). O₂ absorbers have been used in bakery products, like bread and cookies, pastry, cured or smoked meats, fish and cheese (Church, 1994). However, few studies regarding the use of O₂ absorber in seafood products are published. Sivertsvik (1997) evaluated the effect of iron-based O₂ absorber on different packed seafoods and concluded that it can extend the shelf life of oxygen sensitive products. The aim of the present work was to study the effect of oxygen absorber on the shelf life of scaled, gutted and packed farmed seabream during chilled storage.

MATERIALS AND METHODS

Raw Materials and Experiments

Immature gilthead seabreams raised in salt ponds (Tavira, Portugal) were fasted for 48 h prior to slaughter by immersion in an ice:sea-water slurry (3:1). The fish were kept in ice and transported to laboratory within 24 h. Upon arrival they were scaled, gutted (including gills) and washed by hand. The average weight was 222.6 ± 20.8 g. Two seabreams were placed in a polypropylene trays ($22 \text{ cm} \times 17 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$) together with one 300 cc iron-based O_2 absorber sachet (Marathon, O-Buster, type FT-Oakland, USA) and packaged in a polyamide/polyethylene gas barrier bag (Vaessen-Schoemaker, Portugal) with transmission rates of 25.0 for O_2 , 61.0 for CO_2 and 8.8 for N_2 , $\text{cc/m}^2/24 \text{ h}$, at 75% RH and 23°C —batch FTE. Batch CAE (control) was same as FTE except the absence of O_2 absorber. All packages (internal volume $\cong 2,635 \text{ cc}$) were sealed by a Multivac A 300/52 machine (Multivac Sepp Haggenmüller KG, Wolfertschwenden, Germany) and stored at $4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$. Another batch, fish with crushed ice in polystyrene boxes, was stored at $0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$ —batch CGE.

Methods

At each sampling day the gas composition inside the packages was measured with a gas analyzer ABISSPRINT (Abiss, Chatillon, France). Four seabreams from each batch (two packages from each packed batch) were taken: two for sensory evaluation and two for microbial and chemical analyses. Sensory evaluation of raw seabream was done by five panelists, according to a scale of 16 demerit points (d.p.) based on skin appearance (brightness/iridescence), abdomen color, shape and color of eyes, and odor, adapted from a freshness scheme developed by Nunes and Pereira (2000) for whole gilthead seabream. For microbial counts, 10 g of fish muscle tissue was homogenized, diluted nine fold in tryptone salt solution (0.85%) and poured onto Plate Count Agar (Merck, Darmstadt, Germany). The plates were incubated at 30°C for 72 h, under aerobic and anaerobic conditions. The pH was measured directly on fish mince, using a surface electrode. Total volatile bases nitrogen (TVB-N) was determined in extracts from 25 g of fish mince homogenized with 50 ml 10% trichloroacetic acid, by a microdiffusion method according to Cobb et al. (1973). Nucleotides and nucleotide catabolites were extracted from 5 g of fish mince homogenized with 25 ml 0.6 M perchloric acid (Mendes et al., 2001) and the separation was done by high performance liquid chromatography, as described by Ryder (1985), on a reverse phase RP-18 $10 \mu\text{m}$, $200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ column. Phosphate buffer (0.1 M, $\text{pH} = 6.95$) composed the mobile phase;

elution was isocratic and detection was done at 254 nm. K-value was calculated according to Saito et al. (1959), using inosine monophosphate, inosine and hypoxanthine concentrations. Peroxide value (POV) was determined following the method of AOAC (1990), on fish oil extracted according to the method described by Bligh and Dyer (1959). Malonaldehyde (MDA) content was determined on fish muscle according to Vyncke (1970). Statistical analysis (Two Way ANOVA and Tukey Multicomparison Test) was conducted using software Statistica (vers. 5.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

The main changes in gas composition occurred in the batch containing O₂ absorber (FTE) within the first two days of storage; O₂ decreased from 18.5 to a concentration of 8.6% (Figure 1), corresponding to 54% reduction. At the 6th day, O₂ levels attained 0.1% and remained constant until the end of storage. In the control batch (CAE), O₂ decreased slowly from 19.4 to 13.6% (30% reduction) over the first 6 days. Such reduction was also observed by Sivertsvik (1997). The concentration of CO₂ in FTE remained below 2% throughout the storage period while a steady increase from 0.6 to 12.7% at 10th day was observed in batch CAE. This increase is mainly due to a higher microbial activity. In fact, after the 6th day aerobic microbial counts were higher in CAE batch than in FTE, respectively 8 and 6 log cfu/g, at day 10 (Figure 2). However, the anaerobic counts were not significantly different ($P > 0.05$) between CAE and FTE throughout the storage period, both reaching 5 log cfu/g at day 8. Iced batch (CGE) registered lower total viable counts than the packed batches, which differ significantly ($P < 0.05$), probably as a result of the leaching effect of melting ice. It is usual to adopt the microbial criteria to define the shelf life of a product. The limit of 10⁷ cfu/g of total bacteria counts for raw fish products (ICMSF, 1986; IFST, 1999) was reached only in CAE batch, after 8 days of storage. Regarding the potential growth of anaerobic pathogen non-proteolytic *Clostridium botulinum* in FTE batch, Sivertsvik et al. (2002) pointed out a low risk when storage temperature and period of MA/vacuum packed fish do not exceed 10°C and 10 days, respectively.

The changes in the pH of the flesh of the samples are shown in Figure 3. The pH of very fresh gilthead seabream was initially 6.24 and then changed to 6.52, 6.47 and 6.43, respectively, in batches FTE (8th day), CGE and CAE (10th day). At day 10, a decrease of pH value to 6.30 was observed in FTE. Taking into account the low levels of O₂ in this batch early in the storage, the growth of facultative anaerobic lactic acid bacteria could explain that decrease.

TVB-N levels close to 19 mg N/100 g were found at the beginning of chilled storage (Figure 4). Similar results have been found by other authors for this species (Nunes and Pereira, 2000; Huidobro et al., 2001). During the first

FIGURE 1. Changes in gas composition inside the packages, during the storage of packed, scaled and gutted gilthead seabream, at $4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$. CAE—packed in air; FTE—packed in air + O_2 absorber. Error bars are the standard deviation ($n = 2$).

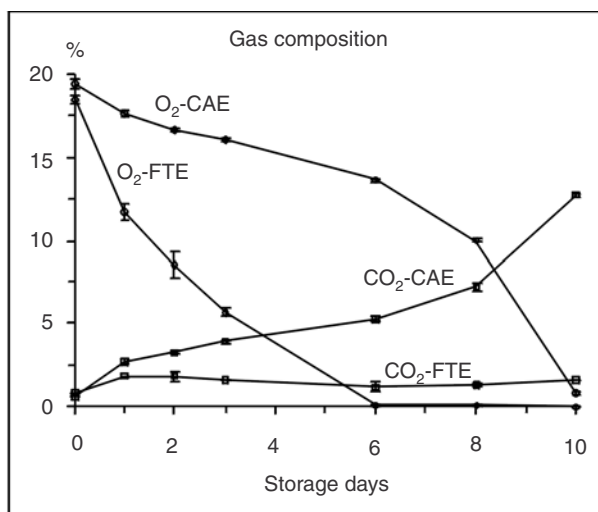


FIGURE 2. Changes in total viable counts (TVC) during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 2$).

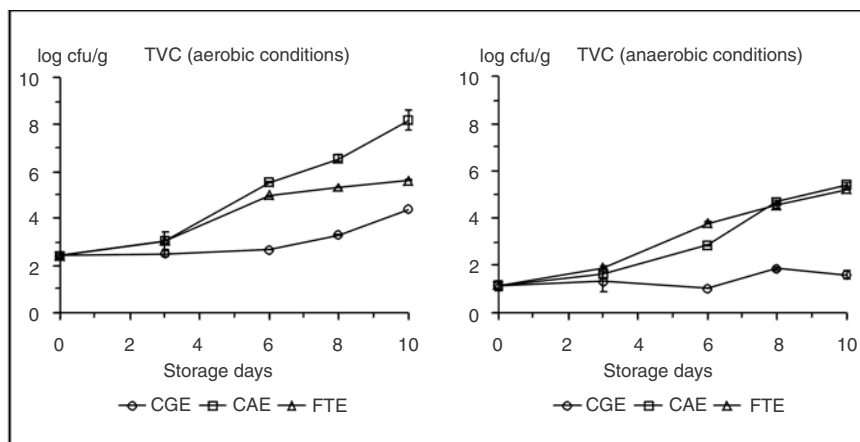


FIGURE 3. Changes in pH values during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 2$).

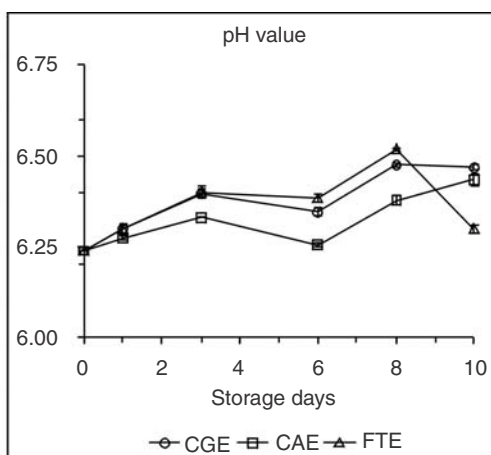
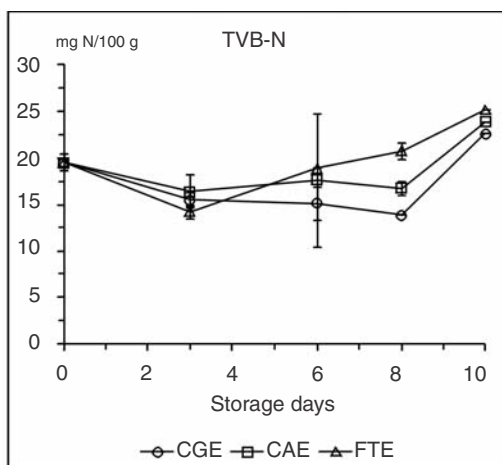


FIGURE 4. Changes in TVB-N contents during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 2$).

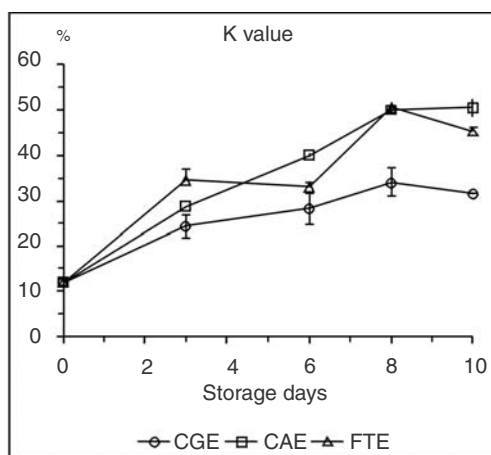


8 days of storage, the volatile compounds content did not differ significantly ($P > 0.05$) and remained between 14-21 mg/100 g in all batches. After day 8th an increase of TVB-N levels up to 25 mg/100 g was observed in the three batches. Values around 20 mg/100 g and lower were reported for whole seabream, during 18-20 days of iced storage (Nunes and Pereira, 2000; Huidrobo et al., 2001).

K value has been routinely used for many years to estimate freshness (Uchiyama et al., 1970; Ehira and Uchiyama, 1983). Figure 5 shows the changes in K value during the chilled storage of scaled and gutted seabream. The K values increased from 12% to 45% and 50% for FTE and CAE, respectively, at the end of storage period. CGE, on the other hand, had significantly ($P < 0.05$) lower K value, probably as a result of the washing effect of melting ice and lower storage temperature on ATP degradation products. The slope was higher in the batch without O_2 absorber ($K = 3.98t + 14.7$, $R^2 = 0.9603$, where K is K value and t time of chilled storage) than in that with absorber ($K = 3.34t + 16.9$, $R^2 = 0.808$). Differences observed between the packed batches were not statistically significant ($P > 0.05$).

Regarding lipid oxidation, a regular increase both in POV (Figure 6) and MDA (Figure 7) contents took place during the storage period. After the 3rd day a significant ($P < 0.05$) increase of hydroperoxides was observed for all

FIGURE 5. Changes in K values during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 2$).



batches, although FTE registered significantly ($P < 0.05$) lower values than CAE and CGE, 38, 52 and 49 meq/kg, respectively, at day 8. Initial value of MDA was $0.2 \mu\text{mol/g}$ of fat (fat content = 4.3%) and during the first 3 days of storage a significant ($P < 0.05$) increase was registered only for batch CAE. At the end of the storage, the lowest value ($0.7 \mu\text{mol/g}$) was observed in batch FTE, which differed significantly ($P < 0.05$) from the other two batches, 1.1 and $0.8 \mu\text{mol/g}$ for CAE and CGE, respectively. Sivertsvik (1997) also recorded a reduction of malonaldehyde formation on salmon fillets packed with O_2 absorber compared with package only in air, respectively 0.3 and 0.6 mg/kg , after 14 days at 4°C . Despite the high values of hydroperoxides, these compounds are odorless (Huss, 1995) and rancid odor became evident in fish when malonaldehyde was above $1\text{--}2 \mu\text{mol/g}$ of fat (Connell, 1975). This could explain the fact that sensory panel did not notice rancid odor in any seabream batch.

Sensory evaluation (Figure 8) of the three batches was similar until the 3rd day. In the following days packed fish received better scores than ice stored fish (CGE), although statistical treatment did not evidence significant differences ($P > 0.05$) between all batches. In general, seabream from all batches presented only slightly bright/iridescent skin due to the elimination of scales. At the end of storage, FTE reached the lowest demerit points, mainly due to a better appearance, in particular the color of abdomen. Nunes and Pereira

FIGURE 6. Changes in peroxide value during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 2$).

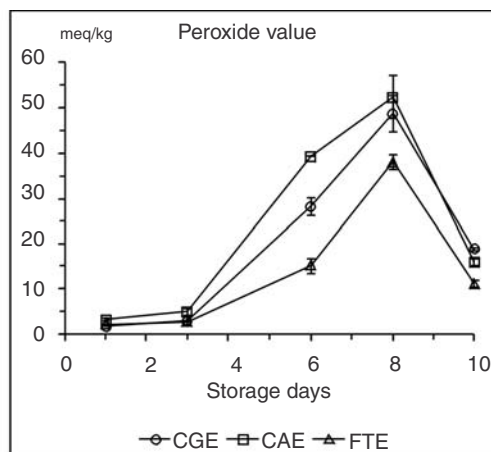


FIGURE 7. Changes in malonaldehyde content during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 2$).

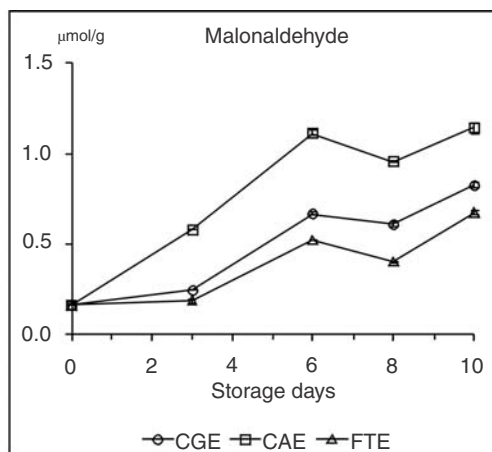
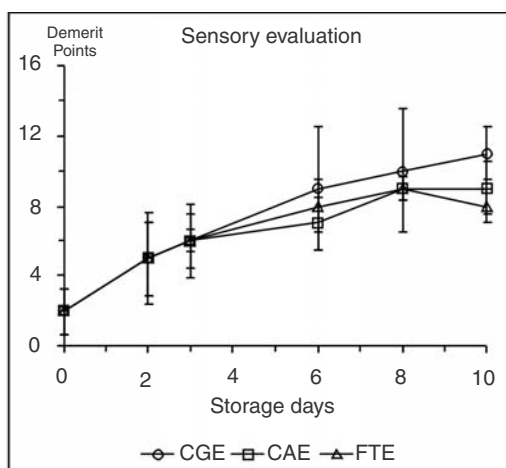


FIGURE 8. Sensory changes (in raw) during the storage of scaled and gutted gilthead seabream, in ice and packed in air. CGE—held in ice ($0.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$); CAE—packed in air ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$); FTE—packed in air + O_2 absorber ($4.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Error bars are the standard deviation ($n = 5$).



(2000) reported a maximum of 6 d.p. (in a total of 20) for top quality seabream, during 4-7 days of ice storage and 6-16 d.p. for acceptable quality until 10 days. Huidobro et al. (2001) applied a similar freshness scheme and registered 10 d.p. for seabream after 10 days of ice storage. In the present work, all batches obtained 6 d.p. (in a total of 16) at the 3rd day. Between the 6 and 10th days, 8-9 d.p were registered for seabream packed with O₂ absorber, whereas batches CAE and CGE were scored with 7-9 and 9-11 d.p., respectively. Therefore, acceptable sensory quality till 10 days was observed, no matter how seabream was stored, in ice or packed, with or without O₂ absorber.

CONCLUSIONS

O₂ absorber was very efficient in the reduction of oxygen concentration inside the packages. However its effectiveness in extending the shelf life of scaled and gutted seabream was not clearly evidenced compared with ice storage. In both cases, a shelf life of 10 days was registered while seabream packed without O₂ absorber had a shelf life of 8 days. Nevertheless, lipid oxidation was significantly reduced in seabream packed with O₂ absorber. Therefore, packaging containing O₂ absorber could prove advantageous for quality preservation when seabream has high fat content, as is usually the case of farmed seabream. This aspect assumes major importance in scaled and gutted seabream, which is particularly susceptible to lipid oxidation due to higher exposure to the air than in the case of whole seabream.

REFERENCES

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington.
- Alvarez, M.F. 2000. Review: Active food packaging. Food Sci. Technol. Int. 6: 97.
- Bligh, E. and Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911.
- Church, N. 1994. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. Trends Food Sci. Technol. 5: 345.
- Cobb, B.F., III, Alaniz, I., and Thompson, C.A., Jr. 1973. Biochemical and microbial studies on shrimp: Volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. J. Food Sci. 38: 431.
- Connell, J.J. 1975. Control of fish quality. Fishing News (Books), Surrey.
- Ehira, S. and Uchiyama, H. 1973. Formation of inosine and hypoxanthine in fish muscle during storage in ice. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 75: 63.
- Huidobro, A., Mendes, R., and Nunes, M.L. 2001. Slaughtering of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in liquid ice: Influence on fish quality. Eur. Food Res. Technol. 213: 267.
- Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fish. Tech. Pap., N° 348, FAO, Rome. 195 p.

- ICMSF. 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: *Microorganisms in food*. Vol. 2, *Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*, The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies *Microorganisms in foods* (Ed.), p. 181. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- IFST. 1999. Development and use of microbiological criteria for foods. Institute of Food Science and Technology, London.
- Mendes, R., Quinta, R., and Nunes, M.L. 2001. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *Eur. Food. Res. Technol.* 212: 141.
- Nunes, M.L. and Pereira, T. 2000. The evaluation of a simple, cheap, rapid method of non-protein determination in fish products through the processing/merchandising chain. Final Report of FAIR PL 96 3253, IPIMAR, Lisbon.
- Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 33: 678.
- Saito, T., Arai, K.I., and Matsuyoshi, M. 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 24: 749.
- Siverstik, M. 1997. Active packaging of seafood. Paper N° 45, presented at 27th Annual WEFTA Meeting, Madrid, October 19-22.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., and Rosnes, J.T. 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products—Significance of microbial growth, activities and safety. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 107.
- Uchiyama, H., Ehira, S., Kobayashi, H., and Shimizu, W. 1970. Significance in measuring volatile bases and trimethylamine nitrogen and nucleotides in fish muscle as indices of freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 36 (2): 177.
- Vyncke, W. 1970. Direct determination of TBA value in TCA extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel* 72: 1084.

ARTIGO 4

EFFECT OF SOLUBLE CO₂ STABILIZATION AND VACUUM PACKAGING IN THE SHELF LIFE OF FARMED SEA BREAM AND SEA BASS FILLETS

Original article

Effect of soluble CO₂ stabilisation and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets

Rogério Mendes* & Amparo Gonçalves

Department of Technological Innovation and Upgrading of Fish Products, National Research Institute on Agriculture and Fisheries – INIAP/IPIMAR, Avenida Brasília, 1449-006, Lisboa, Portugal

(Received 18 December 2007; Accepted in revised form 22 January 2008)

Summary The objective of this study was to determine the differences of sensory, microbiological and chemical quality in vacuum-packaged fillets of sea bream and sea bass previously submitted to soluble gas solubilisation (SGS) with 100% CO₂, at 2 bar for 30 and 60 min and stored at chilled temperature for 15 days. Apart from pH value that showed a regular increase during chilled storage, the other chemical index [total volatile bases nitrogen (TVB-N), trimethylamine nitrogen (TMA-N) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)] had showed to be poor indicators of changes in quality of products. Final TVB-N values ranged from 16.0 to 17.4 mg N per 100 g and from 17.3 to 19.4 mg N per 100 g in sea bream and sea bass, respectively. Sensory evaluation resulted as the most reliable parameter of quality decay. The results show that SGS treatment kept the initial quality of fillets for longer time, which was particularly visible on the sea bream fillets, thus contributing to an extension in 2–3 days of the shelf life. SGS had also a positive effect in the delay of microbial growth.

Keywords Chill storage, quality changes, sea bass, sea bream, shelf life, soluble gas stabilisation, vacuum packaging.

Introduction

Increasing consumer demand for fresh fish is one of the major contemporary trends in fish consumption. The growing need for animal protein for human consumption and mainly these new consumer trends have contributed significantly for the raise of the importance of aquacultured species. On account of this, sea bass and sea bream fish farming in the Mediterranean has increased from 54 000 ton (1996) to 200 000 ton (2006) in a time span of a decade (INFOFISH, 2007). Sea bream and sea bass are economically important fish species in many southern European countries mainly on account of being easily farmed and also because of their desirable aroma and nutritional quality. These species are generally marketed wholesale, gutted or ungutted for immediate consumption at retail stores.

Demand for fresh convenient products that offer healthy, tasty and fast meal solutions stresses, however, the need for new ways of marketing these aquaculture species. A good alternative could be a filleted product in a convenient package, more easy to handle, e.g. in supermarkets and also ready to cook. According to the EEC

Council Directive of 22 July 1991, modified atmosphere-packed and vacuum-packed fish products are considered as fresh products. Consequently, CO₂ can be used for preservation of fresh fish products, when a shelf life extension of only a few days is found to be sufficient.

Modified atmospheres packaging (MAP) together with refrigeration has become increasingly popular as a method of food preservation ensuring quality maintenance with minimum losses (Ashie *et al.*, 1996). To increase shelf life of products, active packaging has emerged within MAP as a new technological development in the field of food packaging and is used whenever the package requires a function other than providing an inert barrier to external conditions. Generally, this technique consists of the addition inside the package of mechanisms to delay the product deterioration, such as gas scavengers or emitters.

Soluble gas stabilisation (SGS) is a relatively recent methodology of active packaging that has been proposed by Sivertsvik (2000) to extend the shelf life of packaged fish.

The action of CO₂ on the bacterial growth, namely, its preservative effect caused by the absorption of CO₂ from the package atmosphere to the product, is well known from the principles in which the MAP techniques are based upon. The application of SGS using elevated

*Correspondent: Fax: +351 213015948;
e-mail: rogerio@ipimar.pt

pressures is done before packaging and the CO₂ is dissolved in the fish at low temperature (~0 °C) and pressures ≥2 bar, according to the following equation:



The dissolvment of CO₂ into fish flesh follows Henry's Law, and at normal pH, most of the CO₂ will exist as dissolved CO₂ (aq) and only about 1% dissociate according to the equation shown. The solubility of CO₂ hence increases with increased partial pressures of CO₂ and therefore also with increased overall pressure. However, the diffusion process follows Ficks 2nd Law and elevated pressure will not increase diffusional speed, but the overall CO₂ absorption rate increases because of the increased solubility at elevated pressures.

The use of this technique would favour a CO₂ supersaturated product that could then be packaged with a smaller g/p (gas/product) ratio or even vacuum packaged. The same effect as normal MAP would therefore be obtained but with reduced packaging volume. Furthermore, using vacuum packaging, the deleterious effects that occur sometimes after a prolonged exposure of products to CO₂ (Sivertsvik *et al.*, 2004; Masniyom *et al.*, 2005; Goulas & Kontominas, 2007) could be avoided. In addition, packaging conditions that reduce the amount of oxygen present in the package (e.g. vacuum packaging) are known to extend the shelf life of product by inhibiting the growth of aerobic spoilage bacteria (FDA, 2001).

In previous work, the effect of soluble CO₂ stabilisation treatment in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets packaged in air was studied (Mendes & Gonçalves, 2008). Despite SGS treatment presented a positive effect on the microbiological quality of the fillets, no significant extension of sensory shelf life was visible as a function of SGS treatment. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of soluble CO₂ stabilisation and vacuum packaging on the quality and shelf life of fillets of farmed sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by monitoring microbiological, sensorial and chemical changes throughout refrigerated storage at 2 °C.

Material and methods

Raw material

Immature farmed sea bream (*S. aurata*) and sea bass (*D. labrax*) raised in tanks (Tavira, Portugal) were fasted for 48 h prior to slaughter by immersion in an ice and seawater slurry (3:1). The fish was kept in ice and transported to laboratory within 24 h. Average weight was 345.2 ± 36.3 and 453.1 ± 52.1 g for sea bream

and sea bass, respectively. Upon arrival, the fish were filleted and the fillets (with skin) were washed by hand and drained. The average weights of fillets were 107.8 ± 15.8 and 193.2 ± 22.8 g, respectively, for sea bream and sea bass.

Soluble gas solubilisation treatment and vacuum packaging

Sets of four fillets from four different fishes were placed skin down in a polypropylene tray (22 cm × 17 cm × 2.5 cm) together with a moisture absorber (size 20 cm × 15 cm × 0.2 cm). For the SGS treatment, the trays were placed inside a constant volume and gas impermeable steel chamber (Ø 50 cm; length 74 cm) at a temperature of 1.0 ± 0.5 °C. The cylindrical chamber was flushed with 100% CO₂ for removal of air and after closure of purging valve, it was kept filled with CO₂ by allowing a continuous supply of CO₂ at 2 bar for 30 and 60 min. The ratio of gas volume to product volume was around 5. The fillets volume was estimated by dividing the fillet mass with muscle density, 1.05 g cm⁻³ (Lowndes, 1955). After SGS treatment, trays were packaged in a polyamide/polyethylene gas barrier bag (Vaessen-Schoemaker, Portugal) with transmission rates of 25.0 for O₂, 61.0 for CO₂ and 8.8 for N₂, cc m⁻² per 24 h, at 75% RH and 23°C. Packages were immediately submitted to partial vacuum (40 mbar) and sealed on a Multivac A 300/52 machine (Multivac, Germany). All packages were stored at 1 ± 0.5 °C, together with the control lot, composed by fillets without the SGS treatment and therefore vacuum packaged directly.

Storage and sampling

During the chilled storage, samples were taken for sensory evaluation, physical/chemical and microbial analysis after 0, 2, 6, 9, 13 and 15 days. Two packages from each batch (control, SGS 30 and SGS 60) were collected, and from each package, two fillets were taken for sensory assessment and the other two fillets were used to prepare a composite sample for microbial analysis, pH value and chemical determinations.

pH value determination

The pH was measured directly on fish mince, using a surface electrode (Metrohm 744, Metrom, Switzerland).

Proximate composition

Moisture, crude protein, ash and fat were determined on day 0 by the procedures described in AOAC (1998). *Moisture* was determined by the air drying method, at 105 ± 2 °C in air oven (Method 950.46). *Crude protein* was determined by Kjeldahl method and the percentage of protein was calculated as total nitrogen × 6.25

(Method 981.10). *Ash* content was determined by incineration of fish muscle (previously dried) in a furnace at 500 ± 25 °C until to constant weight (Method 942.05). *Total fat* was extracted with diethyl ether solvent in a Soxhlet extractor (Method 991.36). Sample was refluxed for 7 h at adjusted temperature. Fat was determined by weight after drying to constant weight in a 105 ± 2 °C air oven.

Total volatile bases nitrogen (TVB-N), trimethylamine nitrogen (TMA-N)

Volatile compounds were determined in extracts from 25 g of fish mince homogenised with 50 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) by a microdiffusion method (Cobb *et al.*, 1973).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

According to Vyncke (1970), lipid oxidation was followed by determining the TBARs. These substances include the malonaldehyde (MDA) which is an oxidative secondary compound.

Microbiological analysis

For microbial counts (total viable counts – TVC), 10 g of fish muscle (a pool of two fillets from each package) was homogenised, diluted ninefold in tryptone salt solution (0.85%) and poured onto Plate Count Agar (Merck, Darmstadt, Germany). The plates were incubated at 30°C for 72 h, under anaerobic conditions.

Sensory evaluation

Sensory evaluation was carried out in a special room equipped with individual booths by a sensory panel composed by four experienced assessors. The fillets were presented to the panel in white-coded dishes. Each panelist assessed one fillet from each lot. The odour and colour of raw fillets were assessed using a category scale (Meilgaard *et al.*, 1999) of five points (1 – putrid odour/evident discoloration; 5 – typical fresh odour/characteristic colour). A score of 3 points was considered as limit of acceptability of raw fillets.

After the raw assessment, the fillets were wrapped with perforated aluminium foil and cooked for 10 min at 100 °C in a saturated steam oven (Rational Combimaster CM6 Cross Kuchentechnik CmbH, Landsberg a. Lech, Germany). The odour and flavour were assessed using the Torry scale (Howgate, 1985), slightly modified, and their scores range from 10 to 3: 10 – very fresh fish, with weak odour/sweet characteristic flavour; 5 – slightly sour/rancid odour, trace of ‘off-flavours’; 3 – putrid or spoiled fish. Average score ≤ 5.5 for odour and flavour is usually used as limit of acceptability. The

texture (firmness and succulence) of fish flesh was also evaluated using the category scale (Meilgaard *et al.*, 1999) of five points (1 – soft/dry; 5 – firm/succulent). Average texture score of 2 was considered as the limit of acceptability of fillets.

Results and discussion

Proximate composition

The proximate composition of fillets of both species at day 0 is presented in Table 1. The results are in accordance with those reported by other authors (Tejada & Huidobro, 2002; Bandarra *et al.*, 2004; Goulas & Kontominas, 2007; Grigorakis, 2007). The fat content in sea bass is higher than the 1.7% value reported by Ozogul *et al.* (2005) in wild specimens, thus reflecting, namely, the specific nutrition and the reduced activity of the farmed fish.

Estimation of dissolved CO₂ in the fish fillets

Under the conditions of our experiments (2 bar 100% CO₂ = 200 kPa CO₂; applied for 30 and 60 min), the concentration of CO₂ as a function of time and fillet thickness can be estimated by the equation proposed by Crank (1975):

$$C_{\text{CO}_2}(t, x) = C_{\text{CO}_2}^{t=\infty} - \frac{4C_{\text{CO}_2}^{t=\infty}}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \times \cos \left[\frac{(2n+1)\pi x}{2x_0} \right] \times \exp \left[-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D}{4x_0^2} t \right]$$

where $C_{\text{CO}_2}^{t=\infty}$ is the amount dissolved CO₂ at equilibrium (mg kg^{-1}), x is the diffusional position, x_0 is the fillet thickness/2 = 0.5 cm, t is the time (seconds) and D is the diffusion coefficient of raw fish fillets = $1.68 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (calculated by Sivertsvik *et al.*, 2004).

The application of Henry's Law: $P_{\text{CO}_2}^{t=\infty} = H_{\text{CO}_2, \text{prod}} \times C_{\text{CO}_2}^{t=\infty}$ allows the estimation of the amount of dissolved CO₂ at equilibrium around 4.43 g kg^{-1} , where $C_{\text{CO}_2}^{t=\infty}$ is the amount dissolved CO₂

Table 1 Proximate composition of the flesh of cultured sea bream and sea bass

Proximate composition (g per100 g flesh)	Sea bream	Sea bass
Protein	19.0 (0.6)	23.9 (0.6)
Fat	5.3 (0.4)	10.7 (0.4)
Moisture	74.2 (0.2)	64.0 (0.2)
Ash	1.21 (0.04)	1.20 (0.04)

Results outcome from the analysis of composite samples. Values in parenthesis are the analytical precision (analyses were done in duplicate).

at equilibrium (mg kg^{-1}), $H_{\text{CO}_2, \text{fish}}$ is the Henry's constant for raw fish fillets = 45.1 Pa ppm^{-1} (calculated by Sivertsvik *et al.*, 2004) and $P_{\text{CO}_2}^{t=\infty}$ is the partial pressure of $\text{CO}_2 = 200 \text{ kPa}$.

Therefore, assuming a uniform geometry of the fillet and a thickness of 1 cm, the amount of CO_2 in the centre of fillets ($x = x_0$) after 30 and 60 min may be estimated as 0.37 and 1.34 g kg^{-1} , respectively.

Microbiological analysis

Taking into account that vacuum packaging creates extremely reduced oxygen conditions, TVC in anaerobic conditions were determined in sea bream and sea bass fillets (Fig. 1). According to Huss (1995), total microbiological counts reflect mainly, the initial contamination characteristic of the capture area, the type of fishing as well as handling conditions not being therefore possible to relate this with the freshness condition. TVC showed relatively low values in all samples at the beginning of the storage ($< 2.0 \text{ log cfu g}^{-1}$), thus indicating that the initial quality of the fish was good and that all the fish handling (filleting, SGS treatment and vacuum packaging) was done correctly. Changes during chilled storage were characterised by a considerably long lag phase, 13 days in sea bream fillets and 9 days in sea bass fillets. In sea bream, SGS treatment had a considerable bacteriostatic effect on bacteria growth, whereas in sea bass, the effect of CO_2 treatment was only visible after 13 days. At the end of storage, bacterial counts in sea bream and sea bass fillets followed the order 60 min SGS $<$ 30 min SGS $<$ control. Final counts were between 1.7 and $2.8 \text{ log cfu g}^{-1}$ in sea bream and between 3.4 and $4.5 \text{ log cfu g}^{-1}$ in sea bass. Mendes & Gonçalves (in press) in a previous study with SGS treatment and air packaging of the same fish species showed the existence of considerably higher TVC (variation range: $2.8\text{--}9.3 \text{ log cfu g}^{-1}$ for sea bream and $2.8\text{--}8.6 \text{ log cfu g}^{-1}$ in sea bass) and a similar order of increase during chilled storage, i.e. 60 min SGS $<$ 30 min SGS $<$ control, thus showing that vac-

uum packaging reinforced the positive effect of SGS treatment on the inhibition of microbial growth. Lower microbial counts in SGS samples can be attributed to the inhibitory effect of CO_2 after dissolution in both the aqueous and fatty phase of fish (Masniyom *et al.*, 2002; Sivertsvik *et al.*, 2002; Ozogul *et al.*, 2004). Genigeorgis (1985) suggested that the anti-microbial activity of CO_2 was a result of the gas being absorbed onto the surface of the food forming carbonic acid, subsequent ionisation of the carbonic acid and a reduction in pH. However, the same author reports this decrease in pH as minimal and probably would not be sufficient to cause any significant bacteriostatic effect. The bacteriostatic effect of CO_2 has been referred as resulting from several factors, namely, the alteration of cell membranes including effects on nutrient uptake and absorption, inhibition of enzymes or decreases in rate of enzyme reactions, changes in the physicochemical properties of proteins and intracellular pH changes (Farber, 1991; Sivertsvik *et al.*, 2002). Sivertsvik (2000) also showed that SGS treatment and vacuum packaging had a positive effect on TVC of chilled salmon fillets. Values attained in these conditions were lower than 6 log cfu g^{-1} after 16 days of storage.

pH value

In Fig. 2, the changes in pH during chilled storage of sea bream and sea bass fillets are presented. Values of pH increased progressively during the storage period, although, in a short range of variation. In sea bream fillets, pH changed from 5.96 to 6.20, whereas in sea bass, pH ranged from 6.09 to 6.43. Debevere & Boskou (1996) report that CO_2 solubilisation in the muscle has a stabilisation effect on pH, thus counteracting the increasing effect that the accumulation of ammonium and other volatile nitrogenous components originated from the bacterial metabolism have on muscle pH (Andersen *et al.*, 1997). No significant changes were also accounted for the SGS treatment. Furthermore and contrary to what would be expected during the first days

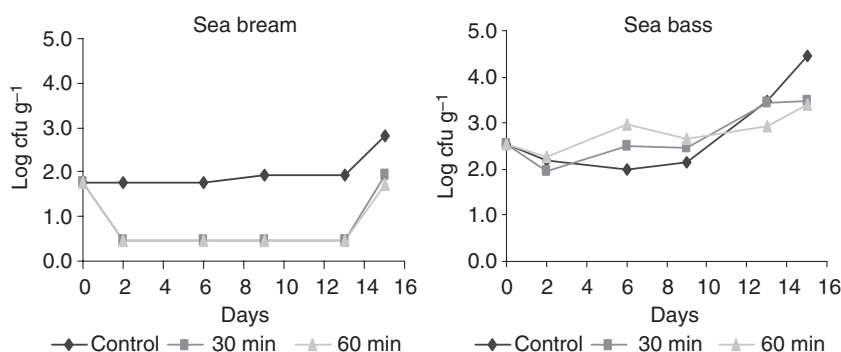


Figure 1 Changes in TVCs (log cfu g^{-1}) of SGS treated and vacuum-packaged fillets of farmed sea bream and sea bass, during chilled storage at $1.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Values outcome from composite sample analysis. Standard deviation of analytical duplicates was $\leq 0.66 \text{ (log cfu g}^{-1}\text{)}$.

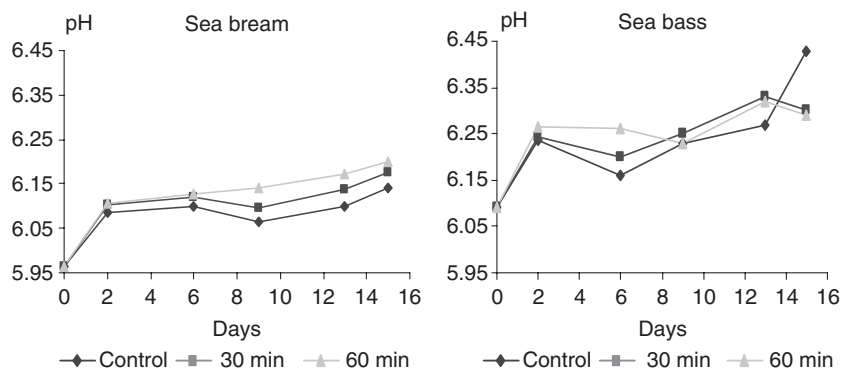


Figure 2 Changes in pH values of SGS treated and vacuum-packaged fillets of farmed sea bream and sea bass, during chilled storage at 1.0 ± 0.5 °C. Values outcome from composite sample analysis. Standard deviation of analytical duplicates was ≤ 0.03 .

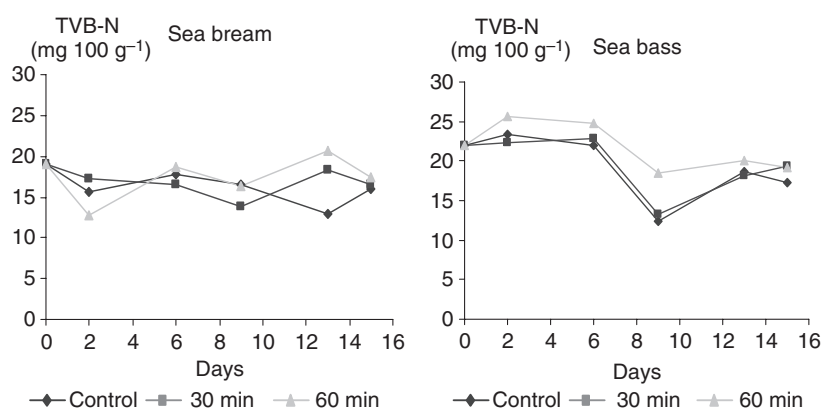


Figure 3 Changes in TVB-N values of SGS treated and vacuum-packaged fillets of farmed sea bream and sea bass, during chilled storage at 1.0 ± 0.5 °C. Values outcome from composite sample analysis. Standard deviation of analytical duplicates was ≤ 0.7 mg N per 100 g.

of chilled storage, increased CO₂ application induced higher absolute pH values in fillets of both species. According to Sivertsvik *et al.* (2002), in fish that is packaged in a rich CO₂ atmosphere, a certain amount of CO₂ dissolves into the product leading to the production of carbonic acid, subsequent ionisation of the carbonic acid and reduction in pH. This decrease in pH was, however, reported by Genigeorgis (1985) as being minimal which seems to be in accordance with the non-existence of important differences in the majority of the samples between control and SGS treated fish. In a previous study with the same fish species packaged in air, Mendes & Gonçalves (*in press*) reported the same behaviour and added that taking into account that the pH was measured not at the fish surface but in a homogenate of the muscle, one possible explanation would be that although pH change can occur at the fish surface, carbonic acid production does not diffuse to the interior of the muscle or that diffusion is insufficient to change significantly the overall muscle pH. Nevertheless, the lower microbiological contamination and lower concentrations of volatile basic nitrogen compounds derived from bacterial metabolism may be accounted in the present study for the lower pH values determined.

Total volatile bases nitrogen

TVB-N values for vacuum-packaged sea bream and sea bass fillets are presented in Fig. 3. TVB-N is a product of bacterial spoilage and endogenous enzymes action, and its content is often used as an index to assess the keeping quality and shelf life of products (Connell, 1995; EEC, 1995). Off-flavouring compounds such as ammonia, monoethylamine, dimethylamine and TMA are responsible for the levels of this index (Connell, 1995; Devere & Boskou, 1996; Ruiz-Capillas & Moral, 2005). The initial TVB-N value of 19.0 and 21.9 mg N per 100 g, respectively, in sea bream and sea bass fillets, is of the same order of magnitude as the value of 14.2 and 17.6 mg N per 100 g reported in our previous work (Mendes & Gonçalves, *in press*). The initial values are also similar to other values reported for fresh sea bream and fresh sea bass. Namely for sea bream, 16 mg N per 100 g at 0 days (Goulas & Kontominas, 2007); 20 mg N per 100 g after 1 day of storage at 2 ± 1 °C (Tejada & Huidobro, 2002); 19 mg N per 100 g at 0 days (Gonçalves *et al.*, 2004) and for sea bass, 19–22 mg N per 100 g at 0 days (Castro *et al.*, 2006); 16 mg N per 100 g at 0 days (Grigorakis *et al.*, 2004); 22.7 mg N per 100 g

and 27.2 mg N per 100 g, respectively, in whole and filleted sea bass stored 1 day in ice (Taliadourou *et al.*, 2003). Small differences in initial TVB-N levels may be related to non-protein nitrogen content which is dependent by his side of factors such as type of fish feeding, season of catching, fish size and also environmental factors (Connell, 1995). Ultimately, TVB-N content is directly related to the initial microbial activity in the fish tissue (Connell, 1995; Kyra *et al.*, 1997; Ozogul *et al.*, 2004).

No significant changes were determined in both species between the control batches and the SGS-treated samples during the total period of chilled storage. No major changes in TVB-N values were also visible during chilled storage. In both species, levels below the limit established by European regulation (EEC, 1995) (35 mg N per 100 g of fish flesh) were observed till the end of storage. Final values ranged from 16.0 to 17.4 mg N per 100 g and from 17.3 and 19.4 mg N per 100 g in sea bream and sea bass, respectively. These values are lower than TVB-N values reported in the previous work, in which SGS-treated fillets were packaged in air (Mendes & Gonçalves, in press) and are possibly the reflection of the lower microbial contamination in vacuum-packaged samples.

Banks *et al.* (1980) report that the differences in TVB-N amounts between fish packaged in air and in MAP must have been caused by a smaller number of bacteria and/or their lower ability to act on the oxidative deamination of non-protein nitrogen compounds. Another explanation advanced (Soccol *et al.*, 2005) refers that anaerobic conditions existent in CO₂ MAP and also in vacuum packaging may inhibit the oxidative deamination because of the lower O₂ quantity. The type of bacteria existing in the fish may depend on atmospheric and pH changes caused by the absorption of CO₂. These bacteria show low capacity to produce ammonia when compared with ordinary aerobic spoilage bacteria. Considering the different deterioration mechanisms of CO₂ MAP and vacuum-packaged fish in comparison with the one that occurs in ice-stored fish, TVB-N

production has been therefore considered as a poor spoilage indicator (Banks *et al.*, 1980; Kyra *et al.*, 1997; Giménez *et al.*, 2002; Tejada & Huidobro, 2002).

Trimethylamine nitrogen

The TMA-N values of vacuum-packaged fillets of sea bream and sea bass are presented in Fig. 4. TMA is part of the non-protein nitrogen fraction of the marine fish flesh and is formed from trimethylamine oxide (TMAO) by bacterial enzymatic activity during spoilage. TMA is mainly responsible for the disagreeable 'fishy' odour. It has been used as a biochemical index to assess the quality and shelf life of marine fish (Connell, 1995; Debevere & Boskou, 1996; Gram & Huss, 1996).

Initial values of TMA-N in sea bream and sea bass were 0.93 and 0.20 mg N per 100 g of flesh, respectively. Sea bream fillets always showed values lower than the initial ones, and concentrations were affected by SGS treatment. The longer the time of CO₂ application during SGS treatment, the lower the amount of TMA-N detected. Levels in sea bass remained unchanged during the entire period of chilled storage. These values are the result of low initial TMAO-N values found for this cultured species, ranged between 3 and 13 mg N per 100 g fish flesh (unpublished data). TMA-N levels in sea bream were of the same order of magnitude of values reported by Goulas & Kontominas (2007), 0.31 mg N per 100 g, 1.51 mg N per 100 g and by Tejada & Huidobro (2002), 0.40 mg N per 100 g. Considerably higher values, 1.51–3.70 mg N per 100 g in sea bream and 0.48–9.72 mg N per 100 g in sea bass, were reported by Mendes & Gonçalves (in press) in SGS-treated samples packaged in air during a 15-day period of chilled storage.

Farber (1965) reported in sole a value of 5 mg N per 100 g when the fish was spoiled. Lannelongue *et al.* (1982) suggested 5 mg N per 100 g as the limit of acceptability for swordfish also. Goulas & Kontominas (2007) used 2–3 mg N per 100 g as limit of acceptability, whereas Kyra *et al.* (1997) and Tejada & Huidobro

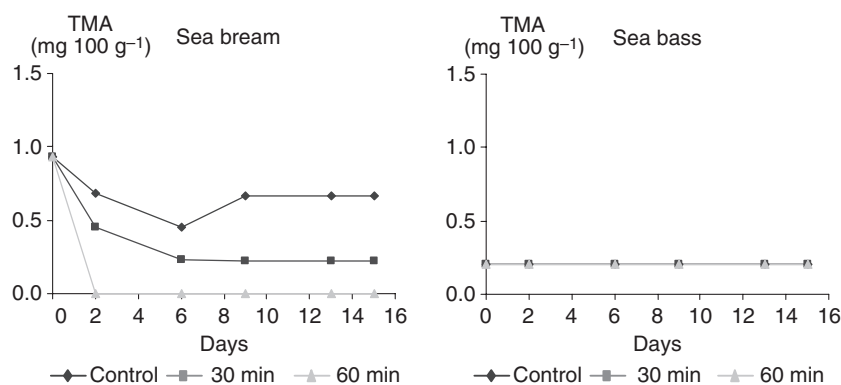


Figure 4 Changes in TMA-N values of SGS treated and vacuum-packaged fillets of farmed sea bream and sea bass, during chilled storage at 1.0 ± 0.5 °C. Values outcome from composite sample analysis. Standard deviation of analytical duplicates was ≤ 0.7 mg N per 100 g.

(2002) used 1 mg N per 100 g. By using any of these limits, samples of sea bream and sea bass were acceptable during the total period of chilled storage. The inexistence of an association with the reduction of sensorial quality hindered, however, the use of TMA-N as a good-quality index in the present study.

Taking into account that the reduction of TMA-O is a property of Gram-negative microorganisms (Lanelongue *et al.*, 1982), the low rate of TMA production in the vacuum-packaged fillets was most likely as a result of a reduction in growth of aerobic, Gram-negative bacteria, including TMA-producing micro-organisms, by CO₂ application during SGS and by low O₂ atmosphere in vacuum packaging.

The non-existence of a direct response with time of TVB-N and TMA-N changes during the chilled storage of sea bream and sea bass fillets prevents the use of these parameters as quality indicator for these species in the packaging conditions studied. Similar results have also been reported by other authors in Sparidae species which is ice stored (Kyrana *et al.*, 1997; Huidobro *et al.*, 2001; Cakli *et al.*, 2006).

Thiobarbituric acid reactive substances

For the assessment of the degree of lipid oxidation, determination of the changes in the TBA index has been recommended (Connell, 1975; Nishimoto *et al.*, 1985). TBA values of sea bream and sea bass (data not shown) were at the beginning 0.45 and 0.02 µmol g⁻¹ fat, respectively. At the end of the storage period of 15 days, TBA values of sea bream fillets ranged from 0.21 to 0.32 µmol g⁻¹ fat and sea bass TBA values ranged from 0.04 to 0.08 µmol g⁻¹ fat. Levels were always under the optimal limit (1–2 µmol g⁻¹ fat) proposed by Connell (1975) for this parameter, and therefore, no signs of oxidation spoilage were determined. Low levels of TBA index were also reported by Grigorakis *et al.* (2004) in sea bass after 15 days of ice storage (1.48 µmol kg⁻¹ tissue equivalent to 0.033 µmol g⁻¹ fat).

SGS treatment did not show any influence in the TBA values. In the previous study, with sea bream and sea bass fillets stored in air (Mendes & Gonçalves, in press), higher TBA values were determined namely in sea bream fillets (0.39–1.23 µmol g⁻¹ fat), therefore showing that vacuum packaging, by removing atmospheric oxygen from the contact with lipids, has a positive effect on the prevention of oxidation spoilage.

Sensory evaluation

The results of the sensory evaluation of vacuum-packaged sea bream and sea bass fillets are presented in Tables 2 and 3. As expected, the sensory scores of the three batches from both species decreased with storage time.

Table 2 Sensory changes during chilled storage (1.0 ± 0.5 °C) of vacuum-packaged sea bream fillets treated with SGS

Sensory parameter	Batches	Storage time (days)					
		0	2	6	9	13	15
Raw ^a							
Odour	Control	4.8	3.8	3.3	3.3	2.5	2.8
	SGS 30	4.8	4.0	3.3	3.3	3.3	2.8
	SGS 60	4.8	4.0	3.5	3.3	3.0	3.0
Colour	Control	4.1	3.3	2.9	2.6	2.3	2.6
	SGS 30	4.1	3.3	2.5	2.8	2.4	2.3
	SGS 60	4.1	3.1	2.9	3.1	2.6	2.0
Cooked							
Odour ^b	Control	9.3	9.0	6.3	6.5	5.3	5.0
	SGS 30	9.3	8.5	6.8	6.8	6.0	5.0
	SGS 60	9.3	8.8	6.8	6.8	5.8	5.0
Flavour ^b	Control	9.5	9.0	5.5	5.3	5.3	4.3
	SGS 30	9.5	8.5	6.5	6.5	5.3	4.3
	SGS 60	9.5	8.3	7.8	6.3	5.5	4.3
Texture ^c	Control	4.3	3.5	2.8	2.9	2.3	2.0
	SGS 30	4.3	3.5	3.0	2.8	2.4	2.1
	SGS 60	4.3	3.5	3.3	3.0	2.5	2.3

Values correspond to the average of four panelists (each assessor evaluated one fillet). Mostly, standard deviation was in the range of 0.5–1.0, except for texture which was ≤0.6.

SGS 30 and SGS 60, fillets pre-treated with SGS (2 bar 100% CO₂, for 30 and 60 min, respectively); Control, fillets without SGS pre-treatment.

^aCategory scale (1–5): 1, putrid odour/evident discolouration; 5, typical fresh odour/characteristic colour.

^bTorry scale (10–3): 10, very fresh fish, with weak odour/sweet characteristic flavour; 5, slightly sour/rancid odour, trace of 'off-flavours'; 3, putrid or spoiled fish.

^cCategory scale (1–5): 1, soft/dry; 5, firm/succulent.

As expected, the most sensitive sensory attribute for quality evaluation of a fish product would be odour. Based on odour scores, raw sea bream fillets treated with SGS received an odour score higher or similar than the acceptability limit (score 3.0) up to 13 days, whereas control sample was scored at the limit of acceptability after 9 days and was rejected on the 13th day. Sea bass fillets presented a similar behaviour in all samples and also an identical shelf life of 13 days. Sivertsvik (2000) reported a positive effect of joint SGS treatment and vacuum packaging on the preservation of an acceptable odour during chilled storage also on salmon fillets.

Colour scores of sea bream and sea bass fillets decreased in all SGS treatments with increasing time of chilled storage. Sea bass fillets (Table 3) kept the characteristic colour of fresh products until the 6th day of storage. On the contrary, sea bream fillets started to lose the characteristic abdominal pink and dorsal grey colours immediately after the 1st day of storage. SGS had a little effect on the colour of fillets during chilled storage.

Table 3 Sensory changes during chilled storage (1.0 ± 0.5 °C) of vacuum-packaged sea bass fillets treated with SGS

Sensory parameter	Batches	Storage time (days)					
		0	2	6	9	13	15
Raw ^a							
Odour	Control	4.5	4.3	3.8	3.3	3.3	2.5
	SGS 30	4.5	4.0	3.8	3.0	3.5	2.8
	SGS 60	4.5	4.0	3.8	3.5	3.3	2.5
Colour	Control	4.0	4.0	4.0	3.0	3.5	3.0
	SGS 30	4.0	4.3	3.8	3.3	3.0	2.5
	SGS 60	4.0	4.0	3.8	3.5	3.3	2.5
Cooked							
Odour ^b	Control	9.5	9.0	7.3	6.8	7.3	5.5
	SGS 30	9.5	8.8	7.3	7.0	7.5	6.5
	SGS 60	9.5	8.8	7.5	6.8	6.5	7.0
Flavour ^b	Control	9.8	8.8	7.0	7.0	7.0	4.8
	SGS 30	9.8	8.0	7.8	6.5	7.0	5.3
	SGS 60	9.8	7.5	7.0	6.5	5.8	6.0
Texture ^c	Control	4.4	3.6	3.8	2.8	3.3	2.8
	SGS 30	4.4	3.3	3.6	3.0	3.1	2.8
	SGS 60	4.4	3.4	3.5	3.1	2.9	3.0

Values correspond to the average of four panelists (each assessor evaluated one fillet). Mostly, standard deviation was in the range of 0.5–1.0, except for texture which was ≤ 0.6 .

SGS 30 and SGS 60, fillets pre-treated with SGS (2 bar 100% CO₂, for 30 and 60 min, respectively); Control, fillets without SGS pre-treatment.

^aCategory scale (1–5): 1, putrid odour/evident discolouration; 5, typical fresh odour/characteristic colour.

^bTorry scale (10–3): 10, very fresh fish, with weak odour/sweet characteristic flavour; 5, slightly sour/rancid odour, trace of 'off-flavours'; 3, putrid or spoiled fish.

^cCategory scale (1–5): 1, soft/dry; 5, firm/succulent.

Torrieri *et al.* (2006) reported also the development of a yellowish colour in sea bass packaged in air, whereas samples in MAP (50% and 70% CO₂) were not so much affected by chilled storage, thus keeping the characteristic colour for a longer period. Effectiveness of MAP (50% CO₂/50% N₂) in comparison to air and vacuum packaging was also shown by Giménez *et al.* (2002) on the maintenance of sea bream fillets colour after 22 days of chilled storage.

Cooked products were sensory rejected on odour (score ≤ 5.5) after 13 (control) and 15 days (SGS batches) in the case of sea bream fillets (Table 2) and were still acceptable at the end of the chilled storage in the case of sea bass fillets (Table 3). At the end of the storage, sea bass fillets were characterised as having neutral odour, whereas control batch was characterised as starting to develop acid and sour odours. Regarding the same parameter, Mendes & Gonçalves (in press) showed on the same fish species which were packaged in air and also SGS treated 2 days less of shelf life. Removal of O₂ from the packages by vacuum packaging may explain the positive effect on the inhibition of rancid odours.

According to flavour, shelf life of sea bream fillets was extended 3 days (from day 6 to day 9) when treated for 30 min in CO₂ and 7 days (from day 6 to day 13) when CO₂ was applied for 60 min.

In the case of sea bass fillets, changes in flavour were less noticeable and shelf life extension was only visible in the samples which were SGS treated for 60 min and rejection was delayed 2 days, from day 13 to 15. Rancid flavours were not detected during chilled storage of vacuum packaging fillets. The use of CO₂ and particularly the vacuum packaging had a positive effect on flavour, although this effect was particularly noticeable on the sea bream fillets chilled stored. Similar results reported by Randell *et al.* (1999) observed the inhibition of rancid taste and flavour when O₂ was removed from the packages in filleted salmon. Sivertsvik (2000) also reports that the removal of oxygen (vacuum packaging) is more important than the level of CO₂ in what concerns odour and flavour of salmon.

In relation to texture, the average value of succulence and firmness was considered to better characterise this parameter. Lower scores than the limit of acceptability (2.0) were never determined during chilled storage of sea bream and sea bass fillets. Although considerable different SGS-treated samples during extended time (60 min) did not show higher absolute texture scores. Torrieri *et al.* (2006) reported that texture of sea bass packaged in MAP with 50–70% CO₂ remained unchanged during chilled storage, whereas control samples with O₂ higher than 20% showed a decrease in texture scores after the 7th day. Sivertsvik *et al.* (2004) report that MAP may affect the sensory quality of products, namely, succulence because of the reduction of the water retention capacity caused by the decrease of pH induced by solubilisation of CO₂ in tissues. With the SGS procedure and vacuum packaging, the reduction of pH was, however, not relevant, nor the development of drip or the loss of succulence, which may be accounted as advantages of this process in relation to the use of high CO₂ concentrations during MAP chilled storage.

In sea bream, stored in ice or packed, with or without O₂ absorber, Gonçalves *et al.* (2004) reported an acceptability limit till 10 days. Giménez *et al.* (2002) also reported that sea bream fillets packaged in vacuum were acceptable for 22 days and kept better quality during chilled storage than when in MAP with 20–30% O₂ but worse than in MAP with 0–10% O₂. Papadopoulos *et al.* (2003) reported a shelf life of 13 and 8 days for ungutted and gutted sea bass stored in ice. In ungutted sea bass, Poli *et al.* (2001) determined a shelf life of 10 days.

Previous work on air packaging of SGS-treated sea bream and sea bass fillets (Mendes & Gonçalves, in press) showed rejection based on odour to occur 4 days before it was seen in this study. Comparison with the

present data shows that vacuum packaging had also a positive effect on the preservation of the characteristic colour and all other sensory attributes of raw and cooked sea bream and sea bass fillets. Vacuum-packaged products were still acceptable at the end of the chilled storage, whereas air-packaged fillets of both species were rejected on account of the yellowish colour after 9 days. Therefore, SGS together with vacuum packaging leads also to an increased shelf life of the fillets when compared with SGS and chilled storage in packages with air.

Conclusions

Apart from pH value that showed a regular increase during chilled storage, the other chemical indices (TVB-N, TMA-N and TBA) showed to be poor indicators of changes in quality of products. Final TVB-N values ranged from 16.0 to 17.4 mg N per 100 g and from 17.3 and 19.4 mg N per 100 g in sea bream and sea bass, respectively.

SGS pre-treatment kept acceptable sensory quality of fillets for longer time, which was particularly visible on the sea bream fillets. Thus, based on a sensory criterion, SGS lead to an extension of the shelf life of the chilled fillets in 2–3 days. At the end of storage, bacterial counts followed the order 60 min SGS < 30 min SGS < control in both species. Treatment of fillets in 100% CO₂ at 2 bar inhibited the microbial growth to levels below the limit of acceptability during the total period of storage. The low microbiological contamination and low TVB-N and TMA-N content derived from bacterial metabolism may be as the result of the low pH values determined.

Acknowledgments

The present study was financially supported by EU-QCA III-MARE/FEDER: Project 'Quality and Innovation of Fishery Products'. The authors would like to thank the farm TIMAR (Tavira, Portugal) for the supply of fish. They would also like to thank Alexandra Gameiro, Carla Pestana and Sofia Antas for their technical assistance on the analyses.

References

- Andersen, U.B., Thomassen, M.S. & Rørå, A.M.B. (1997). Texture properties of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of diet, muscle fat content and time of storage on ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **74**, 347–353.
- AOAC (1998). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th edn, 4th Rev. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists International, Inc., CD-ROM.
- Ashie, I.N.A., Smith, J.P. & Simpson, B.K. (1996). Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, **36**, 87–121.
- Bandarra, N., Calhau, M.A., Oliveira, L. *et al.* (2004). Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. *Publicações Avulsas do IPIMAR, Lisboa*, **11**, 103.
- Banks, H., Nickelson, R. & Finne, G. (1980). Shelf life studies on carbon dioxide packaged finfish from the Gulf of Mexico. *Journal of Food Science*, **45**, 157–162.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T. & Tolasa, S. (2006). Effects of gutting and uncutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bream *Sparus aurata* and sea bass *Dicentrarchus labrax* stored in ice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**, 519–5279.
- Castro, P., Padern, J.C.P., Cansino, M.J.C., Velasquez, E.S. & De Larriva, R.M. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, **17**, 245–248.
- Cobb, B.F. III, Alaniz, I. & Thompson, C.A. Jr (1973). Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *Journal of Food Science*, **38**, 431–436.
- Connell, J.J. (1975). Methods of assessing and selecting for quality. In *Control of Fish Quality*. Editor: J.J. Connell. Pp. 107–132. Surrey: Fishing News Books Ltd.
- Connell, J.J. (1995). *Control of Fish Quality*, 4th edn. Pp. 245. London: Fishing News Books Limited.
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*, 2nd edn. Oxford: Clarendon Press, Pp. 426.
- Debevere, J. & Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology*, **31**, 221–229.
- EEC (1995). Decision 95/149/EC. Total volatile basic nitrogen TVB-N limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Official Journal*, **L097**, 84–87.
- Farber, L. (1965). *Review of the Method for the Determination of Spoilage of Fish*. Pp. 58–70. London: Fishing News.
- Farber, J.M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology – a review. *Journal of Food Protection*, **54**, 58–70.
- FDA (2001). *Clostridium botulinum* toxin formation (a biological hazard) Ch. 13. In *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 3rd edn. Pp. 83–102. Washington: Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4a.html> [accessed 2 Nov 2007].
- Genigeorgis, C.A. (1985). Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology*, **1**, 237–251.
- Giménez, B., Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G., Roncalés, P. & Beltrán, J.A. (2002). Different packaging conditions to improve shelf life of filleted gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **11**, 275–286.
- Gonçalves, A., Mendes, R. & Nunes, M.L. (2004). Effect of oxygen absorber on the shelf life of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **13**, 49–59.
- Goulas, A.E. & 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.
- Gram, L. & Huss, H.H. (1996). Microbial spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 121–137.
- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: a review. *Aquaculture*, **272**, 55–75.
- Grigorakis, K., Alexis, M., Gialamas, I. & Nikolopoulou, D. (2004). Sensory, microbiological and chemical spoilage of cultured common sea bass *Dicentrarchus labrax* stored in ice: a seasonal differentiation. *European Food Research Technology*, **219**, 584–587.

- Howgate, P. (1985). Approaches to the definition and measurement of the storage life of chilled and frozen fish. In: *Proceeding of International Institute of Refrigeration Commissions C2 and D3* (Edited by Institut International du Froid). Pp. 45–53. Aberdeen.
- Huidobro, A., Mendes, R. & Nunes, M.L. (2001). Slaughtering of gilthead seabream *Sparus aurata* in liquid ice: influence on fish quality. *European Food Research and Technology*, **213**, 267–272.
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, 348. Rome: FAO, Pp. 195.
- INFOFISH (2007). Seabass and Seabream Market Report – May 2007. Technical and trade database. Available at <http://www.infofish.org/marketreports/sas0507.html> [Accessed on 14 December 2007].
- Kyrana, V.R., Lougovois, V.P. & Valsamis, D.S. (1997). Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream *Sparus aurata* stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, **32**, 339–347.
- Lannelongue, M., Finne, G., Hanna, M.O., Nickelson, R. & Vanderzant, C. (1982). Microbiological and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂ enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*, **45**, 1197–1203.
- Lowndes, A.G. (1955). Density of fishes. Some notes on the swimming of fish to be correlated with density, sinking factor and the load carried. *Annals and Magazine of Natural History*, **8**, 241–256.
- Masniyom, P., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2002). Shelf life extension of refrigerated sea bass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 873–880.
- Masniyom, P., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2005). Collagen changes in refrigerated sea bass muscle treated with pyrophosphate and stored in modified- atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, **220**, 322–325.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. & Carr, G. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*, 3rd edn. Pp. 281. London: CRC Press.
- Mendes, R. & Gonçalves, A. (2008). Effect of soluble CO₂ stabilization on the quality of fillets from farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **17**, In press.
- Nishimoto, J., Suwetja, I.K. & Miki, H. (1985). Estimation of keeping freshness period and practical storage life of mackerel muscle during storage at low temperatures. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Kagoshima University*, **34**, 89–96.
- Ozogul, F., Polat, A. & Ozogul, Y. (2004). The effect of modified atmosphere packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, **85**, 49–57.
- Ozogul, F., Gokbulut, C., Ozyurt, G., Ozogul, Y. & Dural, M. (2005). Quality assessment of gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, cling film and aluminium foil. *European Food Research and Technology*, **220**, 292–298.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaiddis, I.N. & Kontominas, M.G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aqua-cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* stored in ice. *Food Microbiology*, **20**, 411–420.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Mecatti, M., Lupi, P. & Gualtieri, M. (2001). Quality outline of European sea bass *Dicentrarchus labrax* reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture*, **202**, 303–315.
- Randell, K., Hattula, T., Skyttä, E., Sivertsvik, M., Bergslien, H. & Ahvenainen, R. (1999). Quality of filleted salmon in various retail packages. *Journal of Food Quality*, **22**, 485–497.
- Ruiz-Capillas, C. & 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.
- Sivertsvik, M. (2000). Use of soluble gas stabilisation to extend shelf-life of fish. In: *Proceedings of 29th WEFTA-Meeting* (edited by S.A. Georgakis). Pp. 79–91. Leptocarya, Pieria, Greece, 10–14 October 1999. Thessaloniki: Greek Society of Food Hygienists and Technologists.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. & Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 107–128.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J.T. & Jeksrud, W.K. (2004). Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. *Journal of Food Engineering*, **63**, 451–458.
- Socol, M.C.H., Oetterer, M., Gallo, C.R., Spoto, M.H.F. & Biato, D.O. (2005). Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *Brazilian Journal of Food Technology*, **8**, 7–15.
- Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Savvaiddis, I.N. & Kontominas, M.G. (2003). Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted ice stored Mediterranean aqua-cultured sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 1373–1379.
- Tejada, M. & Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream *Sparus aurata* during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*, **215**, 1–7.
- Torrieri, E., Cavella, S., Villani, F. & Masi, P. (2006). Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Food Engineering*, **77**, 1078–1086.
- Vyncke, W. (1970). Determination of the ammonia content of fish as an objective quality assessment method. *Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, **35**, 1033–1046.

ARTIGO 5

EFFECT OF ENRICHED OXYGEN ATMOSPHERE STORAGE ON THE QUALITY OF LIVE CLAMS (*Ruditapes decussatus*)

Original article

Effect of enriched oxygen atmosphere storage on the quality of live clams (*Ruditapes decussatus*)

Amparo Gonçalves,^{1*} Sónia Pedro,¹ Aida Duarte² & Maria Leonor Nunes¹

1 Upgrading of Fish and Aquaculture Products Research Unity, National Institute of Biological Resources – INRB, I.P./L-IPIMAR, Avenida Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal

2 Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-019 Lisboa, Portugal

(Received 17 March 2009; Accepted in revised form 16 September 2009)

Summary The purpose of the present work was to study the effect of storage in enriched oxygen atmosphere on the quality of live clams. Purified live clams were packed in 70% O₂/30% N₂. A control batch was prepared in which live clams were wrapped in mesh bags (stored in air). Both batches were stored at 6.1 ± 0.7 °C during 6 days. Sampling and analysis were carried out on days 0 (initial), 3 and 6 of storage. The physiological condition and quality of live clams were evaluated by corporal indices, physical/chemical indicators (pH value, glycogen levels, malondialdehyde), sensory assessment and microbial analysis. Similar physiological conditions of live clams were reported in both storage conditions. The storage under high O₂ atmosphere did not promote the microbial growth. A beneficial effect of high O₂ MAP storage was observed in the preservation of live clam's quality. In particular, a significant positive effect on the typical sweet taste was observed.

Keywords Chill storage, live clams, microbial quality, oxygen enriched atmospheres, sensory quality.

Introduction

World bivalves production (capture plus aquaculture) has increased substantially in the last fifty years, going from nearly 1 million ton in 1950 to about 14.1 million ton in 2005, mainly as a result of the growth in aquaculture production (McLeod, 2007). In Portugal, bivalves' production has a great socio-economic importance, as units are operated mainly by family members, in extensive systems, representing 38% in volume and 43% in value of the national aquaculture production (INE, 2007). This production is centred specially in the South of Portugal (Algarve region), with *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell) being the most produced bivalve species, contributing to 25% of volume and 40% of value of the Portuguese aquaculture production (INE, 2007).

Bivalve shellfish, specially the grooved carpet shell, are much appreciated in Portugal. The usual consumption of raw or lightly cooked bivalves limits the processing and preservation methods suitable for these products. Traditional preservation methods, such as heat, could have detrimental effects on the appearance and taste of bivalve molluscs, which limits their acceptability for many

consumers. Therefore, the use of technologies that could contribute to keeping the initial quality and extend the shelf life of live bivalve appears very interesting.

In Portugal, the conventional way to market bivalve molluscs is wrapped in mesh bags, exposed to air, on ice close to the fish counter. These conditions expose the bivalves to hypoxia stress as well as to high microbial contamination. A good alternative for traditional preservation of live bivalves could be a convenient package, with beneficial atmosphere. The application of modified atmosphere to preserve fishery products has been widely studied (Sivertsvik *et al.*, 2002). The gas composition used is dependent on the species and the extension of shelf life of fish and shellfish products has been reported (Gonçalves *et al.*, 2003; Goulas *et al.*, 2005). However to date, the application of MAP in the preservation of live bivalve molluscs was studied only by Pastoriza *et al.* (2004). These authors found that gas mixtures with high oxygen concentration, above 50%, and absence of carbon dioxide, improve the survival period of live mussels than the storage in air. Nevertheless, different bivalve species can react differently to high oxygen (Widdows *et al.*, 1979), which justifies studies with other species, particularly the ones with commercial importance.

Therefore, the purpose of the present work was to study the effect of enriched oxygen atmosphere on the quality preservation of live clams grooved carpet shell in

*Correspondent: Fax: +351 213015948;
e-mail: amparo@ipimar.pt

comparison with the Portuguese traditional way of storage.

Materials and methods

Raw material

Live purified clams (*Ruditapes decussatus*) of commercial size (average length, width and weight were respectively 22.6 ± 1.7 mm, 30.4 ± 2.5 mm and 5.6 ± 1.3 g), which were collected in production areas in the south of Portugal (Algarve – Ria Formosa) in late September 2007, were transported in air under refrigeration ($6\text{--}8$ °C) to the laboratory at Ipimar within 12 h.

Storage experiments and sampling

Upon arrival at laboratory clams were inspected and dead animals were rejected. The live clams were separated into two batches: one was conditioned as usual, in mesh bags stored in air (control) and the second was packed under 70% O₂/30% N₂ (MAP) in a polyamide/polyethylene gas barrier bags (140 µm of thickness; transmission rates of 25.0, 61.0 and 8.8 cc m⁻² per 24 h, at 75% RH and 23 °C, respectively for O₂, CO₂ and N₂, provided by the supplier Vaessen-Schoemaker (Ovar, Portugal), using a Multivac A 300/52 machine (Multivac Sepp Haggenmüller KG, Wolfertschwenden, Germany). The gas mixture (food-grade) was supplied by Praxair (Ribatejo, Portugal). The internal volume of MAP packages was approximately 1261 cm³. In total, five and six experimental replicates (1 kg of live clams each) were prepared for control and MAP batches, respectively, which were stored at 6.1 ± 0.7 °C during 6 days. Sampling for analysis was carried out upon reception at the laboratory (day 0), days 3 and 6 of storage. At the third day, two replicates from both batches were obtained whereas at the sixth day of storage, three and four replicates were obtained from control and MAP batches, respectively. The clams of each replicate were inspected to calculate the mortality. Any clams with open or damaged shells were discarded if they did not close the valves at percussion. The quality and physiological condition of live clams were evaluated by several parameters: condition index (CI), intervalvar liquid (IL), edible meat yield (EM), sensory properties (odour, appearance, taste and texture), physical and chemical indicators (pH value, glycogen levels, lipid peroxidation). Microbial quality was also evaluated (total viable counts, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Pseudomas* spp.).

Gas composition of MAP batch

The gas composition inside the MAP packages was measured with a gas analyser ABISS LS312P (ABISS, Chatillon, France).

Mortality

In each sampling day clams from each batch replicates were inspected and animals which did not close the valves after percussion were considered dead and therefore rejected. The mortality was calculated as follows:

$$\begin{aligned} \text{mortality (\%)} &= \text{No. dead animals} \times 100 \\ &/(\text{No. live animals} \\ &+ \text{No. dead animals with intact shells} \\ &+ \text{No. animals with damaged shells}) \end{aligned}$$

Corporal indices

Corporal indices were calculated only on live clams, according to Orban *et al.* (2006). At the reception day the fresh weight of thirty clams was recorded. Afterwards, the edible meat (entire soft tissues of each clam) and shells were grouped in three pools of fifteen individuals. The meat together with the intervalvar liquid were placed in a sieve and let to drain during approximately 10 min. The liquid was collected in a beaker which was weighed to determine the intervalvar liquid (IL, %). The drained edible meat and shells were weighed and dried at 105 ± 2 °C in air oven for 24 h to determine the condition index (CI, %) and the edible meat yield (EM, %) as well as the moisture content (AOAC, 1998; Method 950.46). At the third and sixth day of storage two groups of fifteen individuals per replicate of each batch were taken and the above indices were calculated. The results of each replicate were expressed as the average value of the two groups:

$$\text{CI (\%)} = \text{Meat dry weight (g)} \times 100 / \text{shell dry weight (g)}$$

$$\text{EM (\%)} = \text{soft tissues weight (g)} \times 100 / \text{fresh weight (g)}$$

$$\text{IL (\%)} = \text{intervalvar fluid weight (g)} \times 100 / \text{fresh weight (g)}$$

Microbiological analyses

Immediately after examination of mortality, forty live clams per replicate of each batch were taken. All animals were cleaned by scraping, scrubbing and washing under cold running water of potable standard and allowed to drain on clean paper towels. Clams were aseptically shucked and blended for 2–3 min in a Stomacher 400 (Seward, London, UK). Aliquots of 40 g were taken from the blended shellfish homogenate and approximately 100 mL from a measured 360 mL amount of 0.1% peptone solution were added and homogenised again for 3 min. The remainder of the 0.1% peptone solution was added to the homogenate and mixed thoroughly, resulting in a final 1:10 dilution. Adequate

serial dilutions were prepared and inoculations performed in duplicate. Plate count agar (PCA, Oxoid Ltd, Hampshire, UK) was used for total mesophilic aerobic counts (TVC), incubated at 30 °C for 3 days, whereas Pseudomonas agar (PSE, Oxoid Ltd., Hampshire, UK) was used for Pseudomonas spp., incubated at 37 °C for 1–2 days. Results were expressed as log colony forming units (CFU) g⁻¹ sample. *E. coli* was assayed by a two-stage most probable number procedure of five tubes with three dilutions, incorporating a resuscitation step in minerals modified glutamate broth (MMGB, Oxoid Ltd, Hampshire, UK) followed by confirmation in the chromogenic agar tryptone bile agar with X-glucuronide (TBX, Oxoid Ltd) according to Donovan *et al.* (1998). Results were expressed as most probable number (MPN)/100 g of sample. The detection of *Salmonella* was done according to ISO 6579 (2002) in 25 g of the initial sample (day 0). Whenever appropriate, isolates were identified by API systems 20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Results were expressed as presence or absence/25 g of sample.

pH value

In each sampling day 15 live clams were collected from each replicate and the edible meat plus intervalvar liquid were homogenised in a Polytron during 3–5 min to prepare a homogenate for pH determination. Three measurements were made directly in each homogenate using a pH Metrohm 744 pH-Meter.

Chemical analysis

A pool of forty to fifty live clams from each replicate were taken and immediately frozen at –80 °C to cause the death of animals. Few days later the clams were let to semi-thaw and were manually shucked by removing the edible meat (all soft tissues) which was immediately frozen at –80 °C and then freeze-dried during 48 h. The dry samples were powdered and stored at –80 °C until analyses.

Proximate composition (except moisture)

The ash, crude protein and fat contents were determined at the reception day by the reference methods described in AOAC (1998) in dry samples of edible meat (two pools of forty individuals per each replicate). Ash was determined by incineration of approximately 1 g of dry matter in a furnace at 500 ± 25 °C until to constant weight (Method 942.05). Crude protein was determined by Kjeldahl method and the percentage of protein was calculated as total nitrogen × 6.25 (Method 981.10). Total Fat content was determined by acid hydrolysis (36% hydrochloric acid) of dry samples during 90 min, followed by fat extraction with ether (Methods 948.15 and 922.06). After hydrolysis, the

mixture was transferred to a separator funnel and 25 mL of diethyl ether was added. The mixture was shaken vigorously during 1 min. This step was repeated with 25 mL of petroleum ether. The mixture was let to stand until the ether fat solution was clear, which was collected through a filter to a flat bottom flask. After evaporation of ethers, fat content was determined by weight after drying to constant weight in a 105 ± 2 °C air oven. The moisture content was also determined, according to the reference AOAC Method (950.46), to calculate the ratio wet weight/dry weight to convert the result in wet basis.

Glycogen content

The amount of glycogen in the edible meat of clams was determined according to the method described by Viles & Silverman (1949). Dry samples (25 mg) were boiled with 15 mL of 33% potassium hydroxide for 15 min. After cooling, 0.250 mL was taken and diluted with 0.250 mL water. 50 µL of a saturated sodium sulphate solution were added (micropipette Biohit mLine, Biohit, Helsinki, Finland) plus 2 mL of ethanol. Samples were placed in an ice bath for glycogen precipitation (~30 min). Following centrifugation (8 min, 9000 rpm), the precipitate was dissolved in 0.5 mL of distilled water, again precipitated with 1 mL of ethanol (during 30 min) and centrifuged. The precipitate was redissolved in 0.5 mL of distilled water and 3 mL of anthrone-reagent was added and the mixture was heated at 90 °C for 20 min. The absorbance was measured at 620 nm. A calibration curve was prepared using glycogen (Sigma) as a standard. The anthrone-reagent was prepared with 114 mL of concentrated sulphuric acid added to 45 mL of distilled water and 0.225 g of anthrone. The results were expressed as g/100 g wet weight.

Malondialdehyde

Malondialdehyde (MDA) determination was carried out according to the method described by Cordis *et al.* (1998). Deproteinisation of 1 g of dry samples was performed with 10 mL of 7.5% (p/v) TCA solution (containing 0.1% propyl gallate and 0.1% EDTA). The supernatant (1 mL) was mixed with 100 µL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) reagent (5 mM DNPH in 2 M HCl, pH 0.1). Hexane (4 mL) was added to this mixture which was vigorously agitated. The organic layer containing the MDA was removed and the procedure was repeated one more time. The combined hexane extracts were dried under nitrogen flux at room temperature (25 °C) and reconstituted in 50 µL acetonitrile. The extracts was injected onto a HPLC Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), equipped with photodiode array detector. Separation of MDA-DNPH adduct was achieved on a Gemini C₁₈ column (Phenomenex, Torrance, USA),

250 × 4.6 mm, operated isocratically; the mobile phase consisting of 50:50:0.1 water–acetonitrile–acetic acid (v/v/v), pumped at 1.0 mL min⁻¹; detection was done at 310 nm. Calibration curves were constructed with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) which react with DNPH.

Sensory evaluation

The sensory evaluation was carried out in a room by a sensory panel composed by six trained assessors of fish products who were not familiar with the treatment of the samples. A preliminary sensory assessment of live clams stored in air during 3 days was conducted, based on a descriptive method used for mussels (Gokoglu, 2002), to select the most adequate attributes to use on live clams and to prepare the score sheet. The attributes selected were odour (fresh characteristic/weak/seaweed; ammonia like; sulphurous/putrid), colour of edible meat (pearly-white; whitish; yellowish/brownish); taste (sweet/characteristic; bitter/sour) and texture of edible meat (firmness, elasticity and succulence/juiciness). A six point scoring scale, ranged from 0 to 5, associated with bipolar words to anchor some attributes (Meilgaard *et al.*, 1999), was used to express the intensity of the attributes: 0: absent (none); 1: very slight; 2: slight; 3: moderate; 4: moderate to strong; 5: strong intensity.

Assessment of raw clams

The raw freshness of live clams was assessed at the sampling for the corporal indices. The odour and colour of edible meat was assessed, according to the scoring scale. Experimental replicates were independently evaluated. Average scores above 2.0 for ammonia like or sulphurous/putrid odours were used to determine the rejection of the raw product. Any replicate rejected was not used for cooked assessment. If more than 50% of the replicates were rejected, the product was considered unacceptable.

Assessment of cooked clams

Live clams (300–400 g) collected from the acceptable raw replicates of each batch were pooled and placed in tap water during 2–3 h before cooking. The water was replenished once. The clams were placed inside a stainless steel tray and cooked during 2 min at 100 °C in a saturated steam oven (Rational Combi-Master CM6 Cross Kuchentechnik CmbH, Landsberg a. Lech, Germany). The sensory panel assessed the odour, appearance (namely the colour), taste and texture of clams, using the scoring scale. Mean scores above 2.0 for ammonia like/sulphurous/putrid odours or bitter/sour taste, or scores below 2.0 for sweet/characteristic taste determined the rejection of the cooked product.

Statistical analysis

The statistical treatment of the results was performed using Software STATISTICA, vers. 6.1 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA). Significant effects of MAP and storage time on the parameters evaluated was determined by factorial analysis of variance followed by the Tukey Multicomparison Test (Zar, 1999). Significance was tested at $\alpha = 0.05$ ($P < 0.05$).

Results and discussion

The proximate composition of raw material (edible meat) was 81.5 ± 0.3; 1.0 ± 0.1; 12.1 ± 0.0, 4.38 ± 0.14 and 3.90 ± 0.30 g/100 g wet weight, respectively for moisture, fat, protein, ash and glycogen contents. These results are within the range of values reported for other bivalve species (Orban *et al.*, 2004, 2006).

The levels of O₂ inside the packages of MAP batch (Table 1) decreased from initial values around 69.4% to a mean concentration of 48.7% at day 3, corresponding to 30% reduction. After 6 days of storage the continuous O₂ consumption by the clams led to further reduction, ca. 63.5% in relation to the initial oxygen concentration. Among the four experimental replicates of MAP batch on day 6, only one presented O₂ levels below the 21% of the air (a value of 16.5% was found). The decrease in O₂ levels was accompanied by increases in CO₂ throughout the storage period, as a result of the organism's respiration. The concentration of CO₂ increased from 0% at initial up to around 11% at the sixth day of storage. These conditions allow a good survival of the clams as the highest reported mortality (on day 6) was low (around 12%; Table 1) and quite similar to that found for live mussels, stored under 75% O₂/25% N₂, during 6 days at 2–3 °C (Pastoriza *et al.*, 2004). In spite the control clams were exposed to

Table 1 Changes in the gas composition of MAP packages and mortality, during the chill storage of live clams at 6.1 ± 0.7 °C

Storage days	Batch	n*	Gas composition (%)			Mortality (%)
			O ₂	CO ₂	N ₂ [†]	
3	Control	2	na	na	na	0.6 ± 0.0 ^a
	MAP	2	48.7 ± 9.5 ^a	3.8 ± 0.1 ^a	47.5 ± 9.3 ^a	1.2 ± 0.0 ^a
6	Control	3	na	na	na	10.9 ± 3.6 ^b
	MAP	4	25.3 ± 7.6 ^b	10.6 ± 1.6 ^b	64.1 ± 7.6 ^a	12.3 ± 2.6 ^b

*Replicates (mesh bags or packages).

[†]Calculated by difference; na, not analysed.

Control: stored in air (wrapped in mesh bags); MAP: packed in 70% O₂/30% N₂.

At each column, values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

atmospheric air and therefore to higher hypoxia, significant differences in the mortality between the two batches were not found during the entire storage period.

Similarly, the differences between the control clams and the batch stored in high O₂ MAP were statistically not significant in what concerns to the corporal indices CI and EM (Table 2). Neither the storage time nor the storage conditions (air vs. MAP) had significant effect on both indices and the initial values remained almost constant during the entire storage period. This index is a relevant parameter in terms of commercial quality of bivalves since reflects the physiological status and apparent health of animals (Orban *et al.*, 2002, 2004, 2006). The difference observed in EM values in the control batch, between days 3 and 6 is certainly due to natural variability among individuals.

In relation to IL (Table 2), the control at the sixth day presented the lowest volume of intervalvar fluid, which was significantly lower than initial values and MAP batch of day 3. Besides, the values reported for MAP batch were always identical to the initial values. Therefore, it seems that clams packed in 70% O₂/30% N₂ maintained their valves closed or semi-closed during longer time than the clams stored in air, losing lower amount of intervalvar fluid. This aspect is essential because IL has importance in the appearance (moist and glossy) as well as in the taste of edible meat.

The CI of bivalves is strictly related with the utilisation of biochemical reserves which can result in a decrease of body weight and therefore in CI changes (Hummel *et al.*, 1989; Albentosa *et al.*, 2007). As it was seen above, CI was not significantly affected by the storage time or the storage conditions (air against MAP) and the evolution of glycogen contents (results not shown) during the storage followed the same pattern as for CI. Similar glycogen levels in the edible meat, around 4.0 g/100 g (dry weight) were reported in both batches. Such result is positive as the glycogen content

contributes to the organoleptic properties of bivalve's edible meat. Other authors have reported the use of glycogen (which is the first biochemical reserve to be consumed only several days after stress exposure, namely after starvation or nutritive stress (Hummel *et al.*, 1989; Albentosa *et al.*, 2007). In particular, at low temperature (5 °C) Hummel *et al.* (1989) reported a latent period during which the bivalves did not use the reserves and a strong decrease in the glycogen levels occurred only after 7 days of air exposure.

The changes in the pH value of the flesh of live bivalves are also used as a stress indicator (Hummel *et al.*, 1989; Pastoriza *et al.*, 2004) reflecting if the organisms shift their metabolism to anaerobiosis (by closing their valves), resulting in the production of acids. Some bivalves species can maintain both aerobic and anaerobic metabolism by intermittent shell gaping (Widdows *et al.*, 1979). Under the experimental conditions of this study, the clams stored in air presented lower pH values than the clams stored under high oxygen atmosphere (Fig. 1). Such significant differences reflect that MAP clams had higher available oxygen that allowed keeping its metabolism predominantly aerobic. The increase in the pH values observed in both batches (4 and 10%, for control and MAP batches, respectively) is in accordance with the low glycogen utilisation.

MDA, which is a product of lipid peroxidation, has been used extensively to assess detrimental effects of stress conditions (Pellerin-Massicotte, 1994). MDA is the result of overproduction of oxyradicals in cells, which biological membranes are rich in highly oxidable polyunsaturated fatty acids. In spite the low fat content of raw material (1.0 g/100 g edible meat, wet basis), the effect of the exposure of live clams to a hyperoxic atmosphere was also evaluated in this study. The MDA-DNPH adducts from all the samples analysed

Table 2 Condition index (CI), intervalvar liquid (IL) and edible meat yield (EM) in live clams, during the storage at 6.1 ± 0.7 °C

Days of storage	Batch	n*	CI (% dw)	IL (% fw)	EM (% fw)
0	Initial	3 [†]	10.0 ± 0.9 ^a	15.1 ± 2.1 ^b	24.8 ± 1.4 ^{ab}
3	Control	2	9.4 ± 0.7 ^a	14.1 ± 2.7 ^{ab}	24.0 ± 0.3 ^a
	MAP	2	10.1 ± 0.1 ^a	18.7 ± 0.2 ^c	24.4 ± 0.0 ^{ab}
6	Control	3	10.0 ± 0.1 ^a	9.2 ± 0.3 ^a	27.1 ± 0.6 ^b
	MAP	4	9.6 ± 0.5 ^a	13.6 ± 1.3 ^{ab}	25.5 ± 1.1 ^{ab}

Data are the average ± standard deviation.

*Replicates (mesh bags or packages).

[†]Pools of 15 individuals.

dw: dry weight; fw: fresh weight; control: stored in air (wrapped in mesh bags); MAP: packed in 70% O₂/30% N₂. At each column, values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

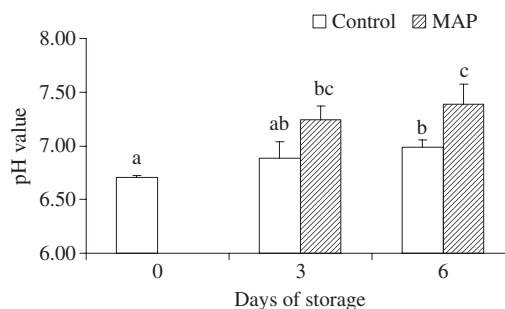


Figure 1 Changes in the pH value of live clams during the chill storage at 6.1 ± 0.7 °C. Data are the average ± standard deviation (day 0: $n = 2$ pools of fifteen individuals; third day: $n = 2$ replicates (mesh bags or packages); sixth day: $n = 3$ and four replicates for control and MAP batches, respectively). Values assigned with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Control: stored in air (wrapped in mesh bags); MAP: packed in 70% O₂/30% N₂.

were lower than the limit of quantification of the method (0.900 mg kg^{-1}). This result indicates that six days of storage under high O_2 MAP (at $\approx 6^\circ\text{C}$) were not enough to affect the oxidative status of clams' tissues.

Regarding to microbial quality, the live clams used in this study were purified in an authorised purification centre, according to the Council Regulation (EC) 853/2004 for the commercialisation of live bivalve mollusks and therefore were considered safe for human consumption. Actually, the analysis done in the initial sample (day 0), when the live clams arrived to the laboratory, confirmed the absence of *Salmonella* spp. but the levels of *E. coli* (which is the EU indicator organism of faecal contamination) were above to the limit of 230 MPN/100 g (Table 3). Thus, the live clams were not in a total compliance with the microbiological criteria established for live bivalve mollusks (Commission Regulation (EC) 1441/2007. This shows that the purification, namely the duration of the process, very often is clearly inadequate for reducing the potential health hazards to an acceptable level. The combination of the experimental work was only possible because it was considered a low risk involving the sensory panel, which were assessing cooked product by steaming at 100°C for 2 min. These conditions guarantee an internal temperature of the bivalve flesh $\geq 90^\circ\text{C}$ during a period ≥ 90 s, according to the Council Regulation (EC) 853/2004.

The levels of *E. coli* did not increase during the six days of storage in both conditions (air and MAP). The same pattern was observed for the *Pseudomonas* spp., which counts remained almost constant from the beginning of the experiment till the end of storage. Regarding to the TVC, significant differences were found only between the extreme values of the control from day 3 and day 6. The storage under high O_2 atmosphere did not promote the growth of generic microorganisms (such as aerobic bacteria enumerated by TVC) or the growth of pathogenic bacteria. These results are quite concordant with those reported by Pastoriza *et al.* (2004) in live mussels packed in enriched oxygen gas mixture (75% $\text{O}_2/25\% \text{N}_2$) during 6 days of storage at $2\text{--}3^\circ\text{C}$. Jacxsens *et al.* (2001) reported a retarded growth at

Table 4 Sensory changes (raw assessment) during the chill storage of live clams at $6.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$

Sensory parameter	Batch	Storage time (days)		
		0 (initial)	3	6
Odour (Fresh, characteristic weak)	Control	4.7 ± 0.5^a	3.0 ± 0.0^b	1.3 ± 0.8^c
	MAP	–	3.5 ± 0.8^{ab}	2.0 ± 0.9^c
Appearance (meat) Pearly-white colour	Control	5.0 ± 0.0^a	3.7 ± 0.5^{ab}	2.2 ± 1.8^b
	MAP	–	3.5 ± 0.8^{ab}	2.5 ± 1.4^b
Whitish colour	Control	0.0 ± 0.0^a	0.3 ± 0.5^{ab}	1.0 ± 0.6^b
	MAP	–	0.5 ± 0.5^{ab}	0.8 ± 0.4^b

Data are average \pm standard deviation (replicates of each batch were independently assessed by six assessors. On day 0, a pool of several individuals was evaluated; on day 3, two replicates and on day 6, three and four replicates, for control and MAP batches, respectively). Attributes intensity ranged from 0 (absent) to 5 (strong). For each sensory attribute, values assigned different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Control: stored in air (wrapped in mesh bags); MAP: packed in 70% $\text{O}_2/30\% \text{N}_2$

4°C of typical spoilage organisms, such as *Pseudomonas fluorescens*, moulds and some pathogenic bacteria in atmospheres containing 70–95% O_2 .

In respect to sensory results, initially raw clams (Table 4) were scored as presented strong fresh, characteristic weak/seaweed odour (average score close to the maximum of the scoring scale) while in the third day this attribute was scored only as moderate in both batches. Other odours were not perceived by the panelists. The appearance of meat was classified as bright pearly-white and smooth-textured (Table 4). At the sixth day, among the three replicates from the control, independently assessed, one was rejected by the panel, due to the presence of slightly putrid odour (score 2). For this reason this replicate was not used for cooked assessment. One replicate from MAP batch was not also used for cooked assessment because its oxygen levels were below the air (16%). Significant differences in the colour of raw meat were not detected between the two batches (Table 4).

In relation to cooked product (Table 5), the initial clams (edible meat) were characterised by a fresh

Table 3 Microbial changes in live clams, during the storage at $6.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$

Days of storage	Batch	TVC (Log cfu g^{-1})	PSE (Log cfu g^{-1})	<i>E. coli</i> (Log MPN/100 g)
0	Initial	2.90 ± 0.28^{ab}	3.30 ± 0.25^a	3.50 ± 0.25^a
3	Control	2.40 ± 0.14^a	3.40 ± 0.28^a	2.90 ± 0.00^a
	MAP	2.80 ± 0.00^{ab}	3.15 ± 0.49^a	3.20 ± 0.42^a
6	Control	3.50 ± 0.28^b	3.20 ± 0.28^a	2.70 ± 0.56^a
	MAP	3.25 ± 0.21^b	3.15 ± 0.35^a	3.05 ± 0.21^a

Data are the average \pm standard deviation ($n = 2$ replicates analysed, each of them was a pool of forty individuals). TVC: total viable counts; PSE: *Pseudomonas* spp.; *E. coli*: *Escherichia coli*. Control: stored in air (wrapped in mesh bags); MAP: packed in 70% $\text{O}_2/30\% \text{N}_2$. At each column, values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 5 Sensory changes during the chill storage of live clams at 6.1 ± 0.7 °C (clams were assessed after cooking)

Sensory parameter	Batch	Storage time (days)		
		0 (initial)	3	6
Odour (Fresh, characteristic weak)	Control	3.5 ± 0.6 ^a	2.8 ± 0.5 ^a	0.3 ± 0.5 ^b
	MAP	–	3.3 ± 0.5 ^a	0.8 ± 1.0 ^b
Appearance (meat) Pearly-white colour	Control	4.5 ± 0.6 ^a	3.0 ± 0.9 ^{bc}	2.8 ± 0.5 ^{bc}
	MAP	–	3.4 ± 0.8 ^{ab}	2.0 ± 0.0 ^c
Whitish colour	Control	0.0 ± 0.0 ^a	1.7 ± 0.3 ^b	2.3 ± 1.0 ^b
	MAP	–	1.8 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.6 ^b
Taste (fresh, characteristic sweet)	Control	3.7 ± 0.9 ^a	4.0 ± 0.0 ^a	1.8 ± 0.4 ^b
	MAP	–	3.8 ± 0.5 ^a	3.3 ± 0.5 ^a
Texture Firmness	Control	4.5 ± 0.6 ^a	4.6 ± 0.9 ^a	3.8 ± 0.4 ^a
	MAP	–	4.7 ± 0.6 ^a	4.0 ± 0.1 ^a
Succulence (Juiciness)	Control	4.8 ± 0.5 ^a	4.5 ± 0.6 ^{ab}	3.4 ± 0.8 ^b
	MAP	–	4.3 ± 0.5 ^{ab}	3.8 ± 0.5 ^{ab}

Data are mean ± standard deviation (Pooled samples of two replicates per each batch were assessed by six assessors. On day 6th, three replicates of MAP batch were used. On day 0, a pool of several individuals was evaluated). Attributes intensity ranged from 0 (absent) to 5 (strong). For each sensory attribute, values assigned different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Control: stored in air (wrapped in mesh bags); MAP: packed in 70% O₂/30% N₂.

weak/seaweeded odour and a typical sweet taste. The texture of meat was considered very firm, elastic and juicy (average scores close to 5, respectively for firmness and succulence). The appearance of cooked meat was characterised as silky, with bright pearly-white colour. The taste and the texture were the mostly appreciated attributes and were considered exceptional traits of clams. In particular, the typical sweet taste combined with the firmness and juiciness of the meat make this product of exceptional quality.

During the later days of storage a gradual decrease in the attributes scores was observed in both batches reflecting the decline of freshness and quality of clams. The odour followed by the taste and appearance were the attributes that undergo the major changes. The meat significantly lost the pearly-white colour (Table 5) and became whitish somewhat yellowish/brownish in both batches. Also the fine-textured/smooth appearance disappeared. Some panelists detected fairly bitter taste in both batches at the end of storage (scores within the range 0.0–2.0). However, ammonia like or sulphurous/putrid odours were not detected by the sensory panel. The changes in the texture traits were mainly due to the decrease of juiciness.

Regarding differences between the two batches, they were statistically significant for taste at the sixth day of storage (Table 5). In fact, the typical sweet taste of clams was scored as moderate in MAP batch whereas the control was scored below the limit of acceptability (score 2.0). Based on the taste scores, the control batch

was considered unacceptable at the sixth day of storage while the clams stored under high O₂ atmosphere presented still acceptable sensory quality. Taking into consideration the taste is a sensory attribute of major importance to the acceptability of food product, the above result suggests the potential benefit of this technology in the preservation of the sensory quality of live clams, compared with the storage in air.

Conclusions

Live clams stored both in air (wrapped in mesh bags) and packed in 70% O₂/30% N₂ during 6 days at 6.1 ± 0.7 °C presented similar physiological conditions and health status. The storage under high O₂ atmosphere did not promote the growth of generic microorganisms or the growth of pathogenic bacteria. A significant benefit of high O₂ MAP storage was observed in the preservation of the characteristic sweet taste, which contributes to keep the live clams with acceptable sensory quality at the end of storage period. Contrary, the clams stored in air were considered unacceptable. Therefore, high O₂ MAP storage could provide an advantageous technology for the preservation of sensory quality of live clams. Further, studies should be done to test other O₂ concentrations and longer storage periods in order to evaluate the effectiveness of this technology, in particular to extend the shelf life of live clams.

Acknowledgments

This work was financial supported by EU-QCA III-MARE/FEDER: Project “Quality and Innovation of Fishery Products”. We thank to Cooperativa Formosa (Algarve, Portugal) for the supply of live clams, to Praxair Portugal Gases, S.A., for the kindly supply of gas mixture and to Patrícia Anacleto, Patrícia Oliveira and Carlos Cardoso for their technical assistance. Special thanks to the people who composed the sensory panel for their availability.

References

- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U. & Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **146B**, 241–249.
- AOAC (1998). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th edn. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists International, Inc., CD-ROM.
- Commission Regulation (EC) 1441/2007 (2007). Amending Regulation (EC) n° 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal, L* **322**, 0012–0029.
- Cordis, G.A., Das, D.K. & Riedel, W. (1998). High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by

- photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, **798**, 117–123.
- Council Regulation (EC) 853/2004 (2004). Specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal L*, **139**, 55–205.
- Donovan, T.J., Gallacher, S., Andrews, N.J. *et al.* (1998). Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communicable Disease and Public Health*, **1**, 188–196.
- Gokoglu, N. (2002). A descriptive method for sensory evaluation of mussels. *Lebensmittel – Wissenschaft und - Technology*, **35**, 563–567.
- Gonçalves, A., López-Caballero, M.E. & Nunes, M.L. (2003). Quality changes of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) packed in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, **68**, 2586–2590.
- Goulas, A.E., Chouliara, I., Nessi, E., Kontominas, M.G. & Savvaidis, I.N. (2005). Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 752–760.
- Hummel, H., Wolf, L., Zurburg, W., Apon, L. & Bogaards, R.H. (1989). The glycogen content in stressed marine bivalves: the initial absence of a decrease. *Comparative Biochemistry Physiology*, **94B**, 729–733.
- INE (2007). *Estatísticas da Pesca 2006*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P., 97 p.
- ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO, 27 pp.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Van der Steen, C. & Debever, J. (2001). Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 197–210.
- McLeod, D. (2007). Bivalves: success in a shell. Association of Scottish Shellfish Growers. Global Trade Conference on Aquaculture, Qingdao, China, 29–31 May 2007 (personal communication).
- Meilgaard, M., Civille, G.V. & Carr, G. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*, 3rd edn. London: CRC Press, 281 pp.
- Orban, E., Di Lena, G., Nevigato, T. *et al.* (2002). Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry*, **77**, 57–65.
- Orban, E., Di Lena, G., Masci, M. *et al.* (2004). Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**, 1929–1938.
- Orban, E., Di Lena, G., Nevigato, T. *et al.* (2006). Nutritional and commercial quality of the striped Venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chemistry*, **101**, 1063–1070.
- Pastoriza, L., Bernardez, M., Sampedro, G., Cabo, M.L. & Herrera, J.J.R. (2004). Elevated concentrations of oxygen on the stability of live refrigerated mussel stored refrigerated. *European Food Research and Technology*, **218**, 415–419.
- Pellerin-Massicotte, J. (1994). Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, **3**, 101–111.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. & Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 107–127.
- Viles, P. & Silverman, J. (1949). Determination of starch and cellulose with anthrone. *Analytical Chemistry*, **21**, 950–953.
- Widdows, J., Bayne, B.L., Livingstone, D.R., Newell, R.I.E. & Donkin, P. (1979). Physiological and biochemical responses of bivalve mollusks to exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **62A**, 301–308.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical Analysis*, 4th edn. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 663 pp.