



José Antônio Salgado de Moura Muniz
Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura

Aproveitamento e Valorização de Polvo da Costa Portuguesa e de Robalo de Aquicultura

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor
em Ciências dos Alimentos

Orientadora: Doutora Maria Leonor Martins Braz de Almeida Nunes,
Investigadora Principal, CIIMAR, Universidade do Porto
Co-orientadora: Doutora Amparo Celeste Gonçalves, Investigadora Auxiliar,
IPMA I.P.
Co-orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Maria João Seixas de Melo, Professora Catedrática, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa
Arguentes: Doutor António Manuel Barros Marques, Investigador Principal, Instituto Português do Mar e Atmosfera – IPMA, I.P.
Doutora Maria do Carmo Martins Serrano, Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
Vogais: Doutora Maria Leonor Martins Braz de Almeida Nunes, Investigadora Principal do CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental) da Universidade do Porto
Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e Atmosfera, IPMA, I.P.
Doutora Ana Luísa Alმაça da Cruz Fernando, Professora Associada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2020

“Aproveitamento e Valorização de Polvo da Costa Portuguesa e de Robalo de Aquacultura” Copy-right © José Antônio Salgado de Moura Muniz, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, que é a força máxima do Universo pela concretização deste novo grau acadêmico.

À Professora Maria Leonor Nunes do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) por ter aceitado orientar-me neste trabalho que com sua simpatia, presteza e amizade sempre foi o alicerce fundamental ao desenvolvimento desta tese.

À Doutora Amparo Celeste Gonçalves, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.), pela supervisão e acompanhamento diário, que com empenho e amizade sempre foi um apoio primordial aos trabalhos desenvolvidos, assim como na coordenação das análises sensoriais.

À Professora Doutora Maria Paula Castilho Duarte pelo aconselhamento técnico e científico e pelo apoio em todos os assuntos relacionados, não só com a logística associada à satisfação das necessidades primárias, mas também com as minhas ligações e do CNPQ com a Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL) e com o IPMA.

Às Doutoradas Helena Lourenço, Narcisa Bandarra e Sónia Pedro do IPMA, pelo apoio e colaboração direta nas análises químicas (elementos e perfil de ácidos gordos) e microbiológicas, respetivamente.

Às técnicas de laboratório do IPMA, Margarida Muro e Júlia Gonçalves pelo apoio prestado na realização das análises químicas.

À doutoranda da FCT-UNL, Carolina Camacho, pela importante colaboração na determinação instrumental da textura e no tratamento de resultados deste trabalho.

Às doutoras Carla Mota, Isabel Castanheira, Inês Coelho e Inês Delgado, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pelo apoio e colaboração na realização das determinações de aminoácidos e de selénio e iodo.

Ao Painel Sensorial do IPMA composto por: António Marques, Carla Pires, Carolina Camacho, Conceição Almeida, Helena Lourenço, Manuel Pires, Mário Mil Homens e Susana Gonçalves.

À bolsista do CIIMAR, Tatiana Correia, pela importante colaboração na revisão do texto deste trabalho, presteza e simpatia.

Ao IPMA, I.P. por ter possibilitado o uso de instalações e equipamentos.

À FCT-UNL pelo apoio na aquisição de materiais e documentação.

À FASTER Indústria de Alimentos e sua equipa de dirigentes e funcionários pela boa vontade e acolhimento na preparação dos produtos à base de polvo.

À GELPEIXE e à AUCHAN por terem autorizado e facilitado a utilização das instalações para a preparação dos filetes de robalo revestidos (congelados e refrigerados, respetivamente).

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento de minha Bolsa de Estudos, um apoio essencial a realização de meu doutoramento no exterior.

À minha família e à minha companheira pelo essencial incentivo e apoio emocional que foram importantíssimos nos momentos difíceis ao longo de meus estudos.

Aos funcionários e colaboradores do IPMA pela colaboração indireta, convivência e simpatia ao longo do período de trabalho neste Instituto.

A todos, mesmo que não citados, colaboraram de forma direta ou indireta na realização deste projeto e ou no meu bem-estar, recebam o meu muito obrigado.

RESUMO

Os hábitos alimentares dos consumidores têm mudado, sendo os produtos prontos a consumir ou a cozinhar cada vez mais preferidos. Por outro lado, alguns industriais da restauração e catering solicitam matérias primas mais convenientes (sobretudo filetes) com tempos de vida útil mais prolongados. No sentido de dar resposta a estas solicitações procedeu-se à cozedura industrial do polvo comum (*Octopus vulgaris*) da costa portuguesa, à caracterização nutricional e à avaliação do seu potencial para confeccionar pratos à base de polvo e, ainda, ao estudo do impacto da congelação e armazenagem em congelado na qualidade. Para aumentar o tempo de vida útil em refrigerado e em congelado de filetes de peixe, usaram-se filetes de robalo (*Dicentrarchus labrax*) de aquacultura como modelo, e foram escolhidos, com base na literatura, dois potenciais revestimentos, o iota carragenato e o quitosano.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o polvo cozido ultracongelado é um produto conveniente pronto a consumir ou para confeções posteriores, proporciona uma excelente contribuição nutricional para uma dieta alimentar equilibrada e apresenta uma grande estabilidade durante a armazenagem em congelado até pelo menos oito meses. Relativamente aos revestimentos foi selecionado o quitosano (soluções a 1,0% e tempos de imersão de 10 segundos) por proporcionar uma melhor aderência, aspeto uniforme e homogéneo e ausência de cheiro. Os resultados da avaliação sensorial, físico-química e microbiológica indicaram que a estabilidade em refrigerado não foi melhorada, muito embora alguma literatura refira efeitos significativos. Relativamente aos filetes armazenados em congelado observaram-se alguns aspetos positivos ao longo de catorze meses de armazenagem devidos ao revestimento, nomeadamente na capacidade de retenção da água e nas contagens microbiológicas totais, pelo que a substituição da água de vidragem por este revestimento poderá vir a ter algum potencial uma vez que poderá contribuir para gastar menores quantidade de água e energia associadas à operação de vidragem.

Termos chave: Pescado; Polvo; Robalo; Tempo de vida útil em refrigerado; Estabilidade em congelado; Quitosano

ABSTRACT

The behaviours of consumers towards food have changed in last years, with products ready to eat or ready to cook increasingly preferred. On the other hand, some food and catering producers request more convenient raw materials (especially fillets) with longer shelf life. In order to answer to these requirements, studies on industrial cooking of common octopus (*Octopus vulgaris*) caught off the Portuguese coast, nutritional characterization and the evaluation of its potential for making dishes based on cooked octopus and, still, the study of the impact of deep freezing and frozen storage quality were carried out. To increase the shelf life of chilled and frozen fish fillets, sea bass fillets (*Dicentrarchus labrax*) were used as a model, and two potential coatings, iota carrageenan and chitosan, were chosen, based on the literature search.

The results obtained allowed us to conclude that the deep-frozen cooked octopus is a convenient product ready for consumption or for further meal's preparations, provides an excellent nutritional contribution to a balanced diet and presented great stability during frozen storage, for at least eight months. Regarding coatings, chitosan (1.0% solutions and immersion times of 10 seconds) was selected since it offers better adhesion, uniform and homogeneous appearance and absence of smell. The results of sensory, physical-chemical, and microbiological evaluations indicated that the cold storage stability was not improved, although several scientific papers have indicated significant effects in shelf-life extension. Regarding the frozen storage stability, some positive aspects were observed for fourteen months due to the coating, namely in the water holding capacity and in the total microbiological counts, so the replacement of the glaze water by this coating may have some potential as it may contribute to spend less water and energy associated to the glazing operation.

Keywords: Seafood; Octopus; Seabass; Cold storage stability; Frozen storage stability; Chitosan

ÍNDICE DE MATÉRIAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações sobre setor da pesca	1
1.1.1. <u>Evolução da pesca no mundo</u>	1
1.1.2. <u>Setor das pescas em Portugal</u>	2
1.2. Espécies a estudar	5
1.2.1. <u>Polvo comum (<i>Octopus vulgaris</i>)</u>	5
1.2.2. <u>Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</u>	7
1.3. Composição bioquímica e nutricional dos produtos da pesca e aquicultura	9
1.3.1. <u>Água</u>	10
1.3.2. <u>Proteínas e outros compostos azotados</u>	10
1.3.3. <u>Lípidos</u>	12
1.3.4. <u>Minerais</u>	15
1.3.5. <u>Vitaminas</u>	16
1.3.6. <u>Hidratos de carbono</u>	17
1.4. Alterações da qualidade dos produtos da pesca e aquicultura	19
1.4.1. <u>Alterações sensoriais</u>	20
1.4.2. <u>Alterações físicas e químicas</u>	21
1.4.2.1. <i>pH</i>	21
1.4.2.2. <i>Catabolismo nucleotídico</i>	21
1.4.2.3. <i>Compostos azotados voláteis</i>	22
1.4.2.4. <i>Aminas biogénicas</i>	22
1.4.2.5. <i>Proteínas e aminoácidos livres</i>	22
1.4.2.6. <i>Lípidos</i>	23
1.4.2.7. <i>Alterações microbiológicas</i>	24
1.4.2.8. <i>Contaminação química</i>	26
1.5. Benefícios associados ao consumo de pescado	37
1.6. Conservação e valorização do pescado	30
1.6.1. Conservação do pescado em refrigerado e congelado	32
1.6.1.1. <i>Refrigeração</i>	32
1.6.1.2. <i>Congelação</i>	32
1.6.2. Outras formas de conservação	34
1.6.2.1. Embalagem em atmosfera modificada (EAM) e ativa (EA)	34
1.6.2.2. Filmes e revestimentos edíveis.....	35

1.6.2.3. Tecnologias não térmicas	36
1.7. Novas formas de apresentação	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1. Matéria prima	41
3.1.1. <u>Polvo comum (<i>Octopus vulgaris</i>)</u>	41
3.1.2. <u>Robalo europeu (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</u>	41
3.2. Preparação do polvo cozido, caldo de cozedura e polvo armazenado congelado	42
3.2.1. <u>Seleção das condições de cozedura do polvo</u>	42
3.2.2. <u>Preparação do polvo cozido e o caldo de cozedura</u>	42
3.2.3. <u>Ultracongelação e conservação do polvo e da água de cozedura</u>	44
3.3. Revestimento e conservação de filetes de robalo.....	45
3.3.1. <u>Preparação das soluções de revestimento, seleção do revestimento e otimização das condições de aplicação (teste prévio)</u>	45
3.3.2. <u>Conservação em refrigerado e em congelado de filetes de robalo revestidos</u>	45
3.4. Métodos químicos para avaliação da qualidade.....	48
3.4.1. <u>Garantia da qualidade analítica</u>	48
3.4.2. <u>Preparação das amostras para análise química</u>	50
3.4.3. <u>Determinação da humidade</u>	51
3.4.4. <u>Determinação da gordura livre</u>	51
3.4.5. <u>Determinação da gordura total</u>	52
3.4.6. <u>Determinação da proteína bruta</u>	52
3.4.7. <u>Determinação da cinza</u>	53
3.4.8. <u>Determinação do perfil de ácidos gordos</u>	53
3.4.9. <u>Determinação de minerais macro, micro e tóxicos</u>	54
3.4.9.1. <u>Potássio, sódio, magnésio, cobre e zinco</u>	54
3.4.9.2. <u>Fósforo</u>	54
3.4.9.3. <u>Iodo e selénio</u>	55
3.4.9.4. <u>Mercúrio total</u>	55
3.4.9.5. <u>Cádmio e chumbo</u>	56
3.4.10. <u>Determinação do perfil de aminoácidos</u>	56
3.4.11. <u>Determinação de compostos azotados voláteis</u>	57
3.4.12. <u>Retenção de nutrientes e contaminantes</u>	58
3.5. Cálculos de parâmetros nutricionais	58

3.5.1. <u>Valor energético</u>	58
3.5.2. <u>Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade</u>	59
3.5.3. <u>Índice de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos (h/H)</u>	59
3.5.4. <u>Índice de polienos</u>	60
3.5.5. <u>Índice de aminoácidos essenciais (Essential amino acid score)</u>	60
3.6. Métodos físicos para avaliação da qualidade	60
3.6.1. <u>Determinação instrumental da textura no polvo cozido</u>	60
3.6.2. <u>Determinação instrumental da textura em filetes de robalo revestidos</u>	61
3.6.3. <u>Determinação instrumental da cor</u>	61
3.6.4. <u>Determinação do teor de água de vidragem</u>	62
3.6.5. <u>Determinação da capacidade de retenção da água</u>	63
3.6.6. <u>Determinação do exsudado</u>	63
3.7. Métodos sensoriais para avaliação da qualidade	64
3.7.1. <u>Polvo cozido ultracongelado</u>	64
3.7.2. <u>Caldo de cozedura do polvo</u>	65
3.7.3. <u>Pratos à base de polvo cozido e caldo de cozedura</u>	65
3.7.3.1. <u>Arroz de polvo</u>	65
3.7.3.2. <u>Polvo à lagareiro</u>	66
3.7.4. <u>Filetes de robalo - seleção do revestimento a usar (teste prévio)</u>	66
3.7.5. <u>Filetes de robalo revestidos conservados em refrigerado e congelado</u>	66
3.8. Métodos microbiológicos para avaliação da qualidade	67
3.8.1. <u>Enumeração de microrganismos viáveis totais (TVC) a 30°C</u>	68
3.8.2. <u>Enumeração de microrganismos viáveis totais (TVC) a 22 °C</u>	68
3.8.3. <u>Enumeração de <i>Pseudomonas</i> spp.</u>	68
3.8.4. <u>Enumeração de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio (H₂S)</u>	68
3.8.5. <u>Enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i></u>	68
3.8.6. <u>Enumeração de Coliformes e <i>E. coli</i></u>	68
3.8.7. <u>Enumeração de mesófilos aeróbios totais esporulados</u>	69
3.9. Análise estatística	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Polvo Cozido e ultracongelado	71
4.1.1. <u>Dados biométricos e rendimentos</u>	71
4.1.2. <u>Efeito da cozedura industrial e ultracongelamento do polvo na composição química e valor nutricional</u>	71
4.1.2.1. <u>Composição aproximada</u>	72

4.1.2.2. <i>Perfil de ácidos gordos</i>	74
4.1.2.3. <i>Perfil de aminoácidos</i>	76
4.1.2.4. <i>Elementos minerais (macroelementos, microelementos e elementos tóxicos)</i>	78
4.1.2.5. <i>Contribuição nutricional</i>	79
4.1.2.5.1. <i>Proteínas</i>	79
4.1.2.5.2. <i>Minerais e ácidos gordos (EPA e DHA)</i>	80
4.1.2.6. <i>Preparação e avaliação sensorial de dois pratos tradicionais à base de polvo cozido</i>	81
4.1.3. <u><i>Efeito na armazenagem em congelado do polvo cozido e do caldo de cozedura no valor nutricional e na qualidade</i></u>	84
4.1.3.1. <i>Composição química e valor energético do polvo congelado</i>	84
4.1.3.2. <i>Perfil de ácidos gordos do polvo congelado</i>	85
4.1.3.3. <i>Perfil de aminoácidos do polvo congelado</i>	87
4.1.3.4. <i>Minerais do polvo congelado</i>	88
4.1.3.5. <i>Contribuição nutricional do polvo congelado</i>	89
4.1.3.5.1. <i>Proteínas</i>	89
4.1.3.5.2. <i>Minerais e ácidos gordos (EPA e DHA)</i>	90
4.1.3.6. <i>Textura do polvo congelado</i>	91
4.1.3.7. <i>Caraterísticas sensoriais do polvo congelado</i>	93
4.1.3.8. <i>Caraterísticas microbiológicas do polvo congelado</i>	94
4.1.3.9. <i>Qualidade do caldo de cozedura congelado</i>	95
4.1.3.9.1. <i>Composição em minerais</i>	95
4.1.3.9.2. <i>Cor</i>	96
4.1.3.9.3. <i>Perfil sensorial</i>	96
4.1.3.9.4. <i>Caraterísticas microbiológicas</i>	97
4.2. Conservação de robalo em refrigerado e congelado	99
4.2.1. <u><i>Seleção do revestimento mais adequado</i></u>	99
4.2.2. <u><i>Conservação em refrigerado de filetes de robalo revestidos com quitosano</i></u>	102
4.2.2.1. <i>Dados biométricos e composição química do robalo</i>	102
4.2.2.2. <i>Evolução da composição química aproximada</i>	102
4.2.2.3. <i>Evolução do azoto básico volátil total (ABVT) e de trimetilamina (ATMA)</i> ... 103	
4.2.2.4. <i>Evolução da textura</i>	105
4.2.2.5. <i>Evolução da cor</i>	106

4.2.2.6. <i>Evolução do exsudado</i>	108
4.2.2.7. <i>Evolução sensorial</i>	109
4.2.2.8. <i>Evolução microbiológica</i>	111
4.2.3. <u>Conservação em congelado de filetes de robalo revestidos com quitosano</u> .	112
4.2.3.1. <i>Retenção da água de vidragem e do revestimento e composição química do robalo</i>	112
4.2.3.2. <i>Evolução da composição química aproximada</i>	113
4.2.3.3. <i>Evolução da água de vidragem e do revestimento</i>	114
4.2.3.4. <i>Evolução da capacidade de retenção da água (WHC)</i>	115
4.2.3.5. <i>Evolução da textura</i>	116
4.2.3.6. <i>Evolução da cor</i>	117
4.2.3.7. <i>Evolução sensorial</i>	120
4.2.3.8. <i>Evolução microbiológica</i>	122
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXO 1 – ESCALA DE INTENSIDADE E ATRIBUTOS/DESCRITORES PARA AVALIAÇÃO DE POLVO	141
ANEXO 2 – ESCALA DE INTENSIDADE E ATRIBUTOS/DESCRITORES PARA AVALIAÇÃO DE FILETES DE ROBALO	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Evolução dos consumos de pescado entre 1950 e 2018 (FAO, 2020)	2
Figura 1.2: ZEE de Portugal e potenciais zonas de expansão	3
Figura 1.3: Valores médios das principais espécies de pescado capturadas em Portugal nos últimos cinco anos (INE, 2020).....	4
Figura 1.4: Distribuição da produção de aquacultura por espécies em 2017	5
Figura 1.5: Dois aspetos do polvo comum <i>Octopus vulgaris</i>	6
Figura 1.6: Infograma sobre o polvo com dados de 2018	6
Figura 1.7: Alcatruzes de plástico e barro e covos de plásticos usados na captura de polvo	7
Figura 1.8: Robalo inteiro e em filetes sem e com pele.....	8
Figura 1.9: Estruturas químicas dos dois principais ácidos gordos presentes no pescado	15
Figura 1.10: Aspeto da distribuição dos miótomos, miocomata e do músculo claro e escuro do salmão.....	18
Figura 1.11: Detalhes da musculatura do braço do polvo <i>Octopus vulgaris</i>	19
Figura 1.12. Novas apresentações, produtos prontos a cozinhar e produtos prontos a consumir	38
Figura 3.1: Aspeto do polvo desembarcado em lota	41
Figura 3.2: Polvo inteiro (1), corte antes da evisceração (2), polvo eviscerado e escorrido (3) e polvo embalado antes da congelação (4).....	41
Figura 3.3: Aspeto dos robalos inteiros e dos filetes	42
Figura 3.4: Diagrama das operações de preparação do polvo cozido e do caldo de cozedura .	43
Figura 3.5: Aspeto de algumas das operações da preparação do polvo e do caldo de cozedura	44
Figura 3.6: Diagrama das operações de preparação de filetes de robalo para conservação em refrigerado e em congelado.....	46
Figura 3.7: Aspeto dos robalos e dos filetes com e sem revestimento, embalados em cuvete com absorvente.....	47
Figura 3.8: Aspeto do analisador de textura TA.XT.plus (Stable Micro Systems) e das amostras de polvo e robalo a analisar respetivamente	62
Figura 3.9: Aspeto de uma cabine individual de prova	64
Figura 3.10: Amostras de polvo para a análise sensorial (a). Aspeto da amostra apresentada aos provadores (b).	64

Figura 3.11: Caldo usado para seleção de descritores (a). Caldos usados na análise sensorial (b). Caldos pós aquecimento (c).	65
Figura 3.12: Aspeto geral da preparação e avaliação sensorial dos filetes cozidos.....	67
Figura 4.1: Aspeto dos dois pratos tradicionais.....	82
Figura 4.2: Perfil sensorial dos pratos de arroz de polvo e polvo no forno.....	83
Figura 4.3. Evolução do perfil sensorial do polvo cozido durante a armazenagem em congelado	94
Figura 4.4. Perfil sensorial do caldo de cozedura do polvo comum durante a armazenagem em congelado.....	97
Figura 4.5. Aspeto dos pedaços de filetes tratados com quitosano nas diferentes condições	100
Figura 4.6. Evolução dos valores médios da percentagem de revestimento de carragenato retido nos filetes ($0,07 \leq DP \leq 0,88$) e da quantidade de carragenato nos filetes (mg/100 g)	100
Figura 4.7. Evolução dos valores médios da percentagem de revestimento de quitosano retido nos filetes ($0,21 \leq DP \leq 1,18$) e da quantidade de quitosano nos filetes (mg/100 g)	101
Figura 4.8. Evolução dos valores médios de ABVT e do ATMA ($0,7 \leq DP \leq 4,7$ para o ABVT e $0,0 \leq DP \leq 0,4$ para o ATMA) em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.....	104
Figura 4.9. Evolução dos valores médios da dureza ($0,25 \leq DP \leq 0,79$) em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.....	106
Figura 4.10. Evolução dos valores médios do índice de brancura ($0,82 \leq DP \leq 4,40$) em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano	108
Figura 4.11. Aspeto dos filetes controlo (a, c, e) e revestidos (b, d, e) na embalagem (a, b), antes da determinação da água de vidragem (c, d) e após determinação da água de vidragem (e, f) (após 3 meses de armazenagem em congelado). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.....	113
Figura 4.12. Aspeto da pele do filete revestido após determinação da água de vidragem	115
Figura 4.13. Evolução da textura nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.....	117
Figura 4.14. Evolução da brancura nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.....	119

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1: Composição química aproximada e valor energético de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal	9
Quadro 1.2: Composição de aminoácidos essenciais (g) por 100 g de parte edível de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal	12
Quadro 1.3: Composição de gordura total, total de PUFA, EPA e DHA em g/100 g na parte edível de algumas espécies de pescado comercializados em Portugal.....	13
Quadro 1.4: Valores médios de alguns minerais em mg/100g de parte edível de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal	16
Quadro 1.5: Teores médios de vitaminas em mg/100g ou µg/100 g de parte edível de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal.	17
Quadro 3.1: Garantia da qualidade dos métodos analíticos da composição química aproximada, ácidos gordos, macro, micro e contaminantes (n=4).	48
Quadro 3.2: Garantia da qualidade do método analítico da composição em aminoácidos (hidrólise ácida em condições anaeróbicas seguida de cromatografia líquida - UPLC), usando o material de referência certificado NIST 3244* (n=3)	50
Quadro 4.1: Principais constituintes do polvo comum cru e cozido e respetivas taxas de retenção e valor energético	72
Quadro 4.2: Ácidos gordos mais abundantes no polvo comum cru e cozido e respetivas taxas de retenção.....	74
Quadro 4.3: Aminoácidos mais abundantes (mg/100 g) no polvo comum cru e cozido e respetivas taxas de retenção	77
Quadro 4.4: Concentração de macromelementos, microelementos e elementos tóxicos no polvo comum e respetivas taxas de retenção	79
Quadro 4.5: Concentrações e score de aminoácidos essenciais do polvo cozido.....	80
Quadro 4.6: Contribuição nutricional do polvo cozido (%) em termos de elementos minerais e EPA+DHA, tendo como referência o consumo de uma porção de 150 g.....	81
Quadro 4.7: Evolução dos teores dos principais constituintes e valor energético do polvo comum cozido armazenado em congelado	84
Quadro 4.8: Evolução dos teores dos principais ácidos gordos e principais índices associados do polvo comum cozido armazenado em congelado	86
Quadro 4.9: Evolução dos teores dos principais aminoácidos do polvo comum cozido armazenado em congelado	87

Quadro 4.10: Evolução dos teores de alguns macroelementos, microelementos e elementos tóxicos do polvo comum cozido armazenado em congelado	89
Quadro 4.11: Evolução dos teores e scores de aminoácidos do polvo comum cozido armazenado em congelado	90
Quadro 4.12: Contribuição nutricional do polvo comum cozido armazenado em congelado em termos de elementos minerais e EPA+DHA, tendo como referência o consumo de uma porção de 150g	91
Quadro 4.13: Evolução da textura do polvo comum cozido armazenado em congelado	92
Quadro 4.14: Evolução microbiológica do polvo comum cozido armazenado em congelado ..	95
Quadro 4.15: Evolução da cor do caldo de cozedura do polvo comum cozido armazenado em congelado	96
Quadro 4.16: Evolução microbiológica do caldo de cozedura do polvo comum cozido armazenado em congelado	98
Quadro 4.17: Composição química aproximada inicial da parte edível do robalo e dos filetes ao longo da conservação em refrigerado	103
Quadro 4.18: Evolução dos parâmetros de cor em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado	106
Quadro 4.19: Evolução da percentagem de exsudado em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.....	109
Quadro 4.20: Evolução dos atributos sensoriais em cru em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado	109
Quadro 4.21: Evolução dos atributos sensoriais em cozido em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.....	110
Quadro 4.22: Evolução dos microrganismos em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado	111
Quadro 4.23: Composição química aproximada da parte edível do robalo e dos filetes e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.....	114
Quadro 4.24: Evolução do teor de água de vidragem e de revestimento ao longo da conservação em congelado	115
Quadro 4.25: Evolução da capacidade de retenção da água nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado	116
Quadro 4.26: Evolução dos parâmetros da cor na zona dorsal nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.....	118
Quadro 4.27: Evolução dos parâmetros da cor na zona ventral nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado	119

Quadro 4.28: Evolução dos atributos sensoriais cheiro e cor em cozido nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado	121
Quadro 4.29: Evolução dos atributos sensoriais sabor, firmeza e suculência em cozido nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado	121
Quadro 4.30: Evolução dos microrganismos em filetes sem e com revestimento de quitosano ao longo da conservação em congelado	122

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE – Aminoácidos essenciais

AANE – Aminoácidos não essenciais

ABVT – Azoto básico volátil total

ATMA- Azoto de trimetilamina

AOTMA- Azoto do óxido de trimetilamina

ATP - Adenosina 5' - trifosfato

ADP - Adenosina 5' - difosfato

AMP - Adenosina 5' - monofosfato

ALA - Ácido gordo α -linolénico

CTR – Filetes de robalo não revestidos com quitosano

DHA - Ácido gordo docosahexaenóico

EA – Embalagem ativa

EAM – Embalagem em atmosfera modificada

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EPA - Ácido gordo eicosapentaenóico

FAO - Organização para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

h - Ácidos gordos hipocolesterolémicos

H - Ácidos gordos hipercolesterolémicos

Hx - Hipoxantina

INE - Instituto Nacional de Estatística

IMP - Inosina 5' - monofosfato

Ino – Inosina

IA – Índice de aterogenicidade

INE – Instituto Nacional de Estatística

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

IT – Índice de trombogenicidade

kW – quilowatt

kcal - quilocalorias

LA - Ácido gordo linoleico

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

MeHg – Metil mercúrio

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

n-3 - Ácidos gordos polinsaturados da família n-3

n-6 - Ácidos gordos polinsaturados da família n-6

OTMA - Óxido de trimetilamina

PI – Índice de polienos

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

PUFA n-3 - Ácidos gordos polinsaturados da família ómega-3

PUFA n-6 - Ácidos gordos polinsaturados da família ómega-6

QUIT – Filetes de robalo revestidos com quitosano

SFA - Ácidos gordos saturados

TMA – Trimetilamina

TPA – Análise do perfil de textura (Texture profile analysis)

TR – Taxa de retenção

TVC – Microrganismos viáveis totais

EU – União Europeia

ZEE - Zona Económica Exclusiva

1 INTRODUÇÃO

Presentemente mais de 800 milhões de pessoas sofrem de subnutrição crónica a nível mundial e estima-se que este número aumente até 2050, altura em que a população mundial atingirá mais de 9 000 milhões de pessoas, especialmente concentradas nas zonas litorais (FAO, 2020). A pesca e a aquacultura vão certamente continuar a ter um importante papel na diminuição da fome e da pobreza e no melhoramento da saúde das gerações futuras, sendo para tal indispensável o uso responsável e sustentado dos recursos aquáticos num contexto de alterações climáticas, forte incerteza financeira e económica e crescente competição pelo acesso aos recursos naturais.

Neste cenário é fundamental o melhor aproveitamento dos recursos da pesca e da aquacultura e equidade no seu abastecimento e uso, para que as gerações futuras possam deles desfrutar em termos nutricionais, sociais, económicos e ambientais. A FAO (2020) destaca a necessidade de um enfoque inovador integrado e multissetorial para a gestão dos recursos aquáticos de forma a se obter melhores benefícios sociais e económicos no sector pesqueiro.

Será lançado no final deste ano (2020) pelo projeto Illuminating Hidden Harvests com a colaboração da FAO, um relatório com o objetivo de apoiar políticas favoráveis às pescas em pequena escala produtiva, sustentáveis e equitativas, focando o fornecimento de nutrição essencial a bilhões de pessoas bem como meios de subsistência e atividade empregatícia para a maior parte dos 120 milhões de pessoas que dependem economicamente da atividade de captura de peixes (Lim, 2020).

1.1 Considerações gerais sobre sector da pesca

1.1.1 Evolução da pesca no mundo

A produção mundial de pescado aumentou nas últimas décadas, tendo atingido mais de 179 milhões de toneladas em 2018 e a produção da aquacultura contribuiu com 82,1 milhões de toneladas (FAO, 2020). Neste ano, cerca de 156,4 milhões de toneladas destinaram-se ao consumo humano e 22,2 milhões de toneladas foram encaminhadas para usos não alimentares e aproximadamente 46% do pescado destinado ao consumo humano direto encontrava-se vivo, fresco ou refrigerado, 12% foi fornecido como seco, salgado, fumado ou curado; 13% sob a forma de conservas e a produção de congelados alcançou 30% (FAO, 2020). Ainda pelos dados mais atuais da FAO, das capturas da pesca (96,4 milhões de toneladas), 84,4 e 12,0 milhões de toneladas são referentes a capturas em águas marinhas e água doce, respetivamente. A aquacultura mesmo com um crescimento a um ritmo mais lento atingiu 82,1 milhões de toneladas 51,3 e 30,8, produzidas respetivamente em águas interiores e marinhas. A FAO (2020) estima que cerca de 35 % do total de pescado foi desperdiçado em 2018.

Os sete países que mais capturaram pescado em 2018 foram a China, Indonésia, Peru, Índia, Rússia e Estados Unidos da América e Vietname, que no conjunto representaram quase 50 por cento da captura global total (FAO, 2020). A anchoveta (*Engraulis ringens*) foi a espécie mais capturada (mais de 7,0 milhões de toneladas), seguida pelo escamudo do Alasca (*Theragra chalcogramma*) com 3,4 milhões de toneladas (FAO, 2020). As capturas dos cefalópodes, grupo de destaque neste trabalho, ultrapassaram 320 mil toneladas em 2018, representando cerca de 5% das capturas totais (FAO, 2020).

O consumo per capita aparente de pescado passou de 9,9 para 18,4 kg entre os anos 1960 e 2015, tendo atingido 20,5 kg em 2018, tendo este aumento sido motivado por vários fatores, tais como: aumento do rendimento e urbanização, além de uma grande expansão na produção piscícola e melhoria nos circuitos de distribuição e comercialização (FAO, 2020). Esta Organização estima que o consumo de pescado atinja 21,5 kg em 2030 e que a fonte de abastecimento seja principalmente a aquacultura. As capturas dos cefalópodes, grupo de destaque neste trabalho, ultrapassaram 320 mil de toneladas em 2018, representando cerca de 5% das capturas totais (FAO, 2020).

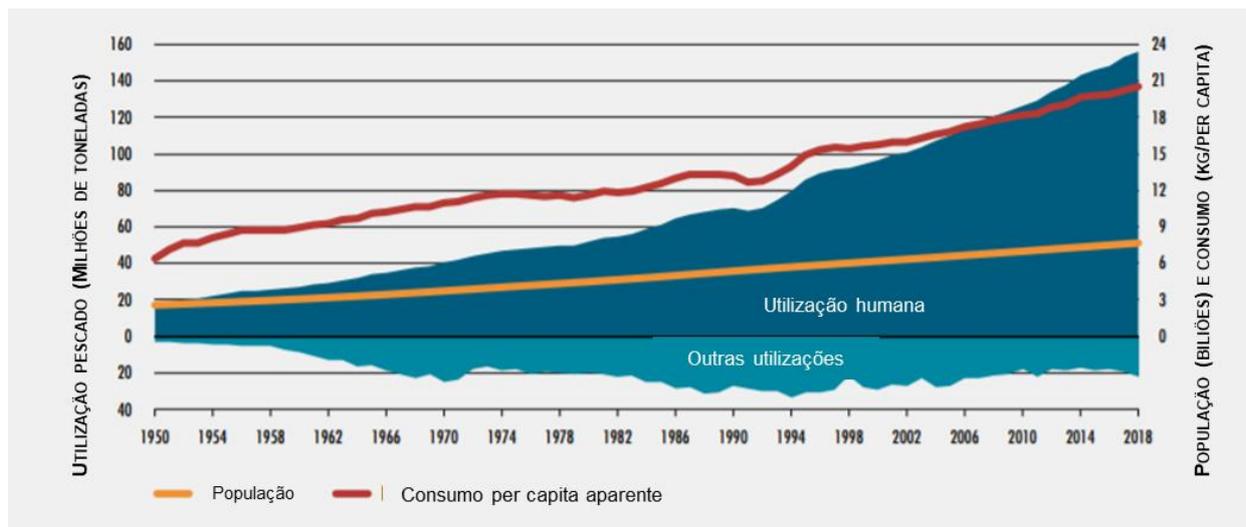


Figura 1.1. Evolução dos consumos de pescado entre 1950 e 2018 (FAO; 2020).

No que se refere a frota pesqueira a nível mundial, o número total de navios envolvidos foi estimado em mais de 4,7 milhões de unidades, sendo que 3,2% desses navios operam em águas marinhas, representando a Ásia 68% e a África 16% (FAO, 2020).

Nos países em desenvolvimento, o pescado destinado ao consumo humano tem sido comercializado predominantemente em fresco, refrigerado ou até mesmo vivo (54%) e nos países desenvolvidos a procura é igualmente elevada em relação aos produtos frescos (cerca de 55%) (FAO, 2020).

Em termos de importância económica, a pesca e a aquicultura garantem a subsistência de cerca de 15% da população mundial, facto que mostra bem o interesse económico e social deste setor (FAO, 2020).

1.1.2 Setor das pescas em Portugal

Portugal é um país europeu com uma Zona Económica Exclusiva (ZEE) de 1.656 mil km², um mar territorial de 64.145 km² e uma plataforma continental de 20.141 km² além da linha costeira de 2.830 km (Figura 1.2), cuja posição geográfica está inserida num ecossistema marinho de águas mais aquecidas que favorece uma elevada diversidade de espécies, tendo, no entanto, um baixo índice de produção. A produção de peixes em águas portuguesas e adjacentes é relativamente baixa e algumas espécies estão sujeitas a ciclos migratórios. Em consequência, a produção nacional não é suficiente para abastecer o

mercado consumidor interno cuja procura é cerca de 57 kg/ano, só ultrapassado pelo Japão e Islândia. No entanto, a contribuição da produção nacional tem sido nos últimos anos pouco superior a 22 kg/ano (INE, 2020).

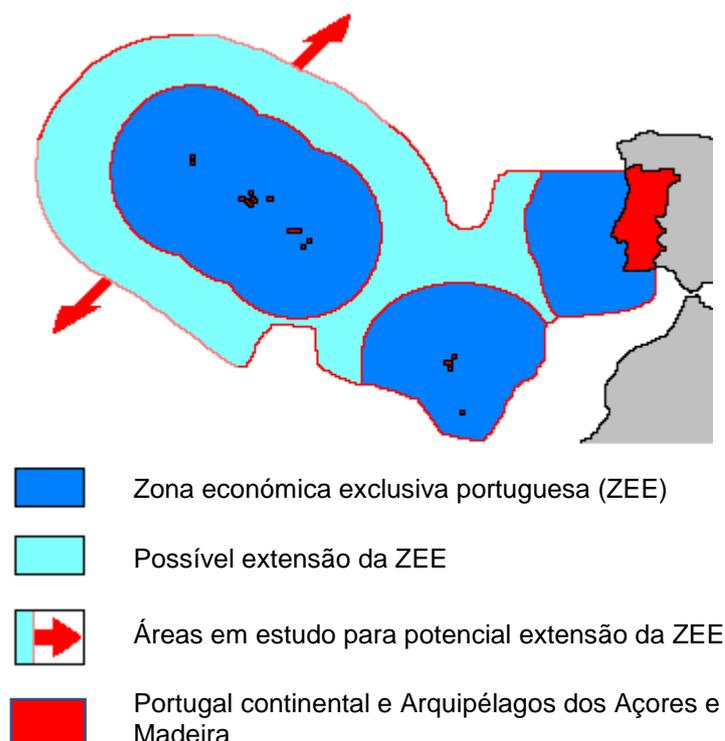


Figura 1.2. ZEE de Portugal e potenciais zonas de expansão (Adaptado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Portugal_Exclusive_Economic_Zone_\(en\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Portugal_Exclusive_Economic_Zone_(en).svg))

Em 2019 o total de capturas da frota portuguesa resultou em 188 537 toneladas de pescado das quais 137 669 toneladas corresponderam a pescado fresco ou refrigerado, transacionado em lota (128 438 toneladas, traduzindo-se num acréscimo de 6,1% da produção e num aumento de valor de 1,2% relativamente a 2018. Este aumento global resultou de um maior volume de capturas quer em águas nacionais quer em pesqueiros externos (INE, 2020). Houve, no entanto, em 2019, uma redução para algumas espécies, sendo de salientar o caso dos atuns, em que as 9 966 toneladas representaram um decréscimo de 24,7%, face a 2018 (INE 2020). No que diz respeito aos moluscos, verificou-se um decréscimo do volume de 13,4% e de 9,7% em valor. Esta situação ficou a dever-se a uma menor captura de polvos (12,9%) e a uma diminuição acentuada da captura de berbigão (57,1%), tendo havido, no entanto, maiores capturas de outros moluscos, nomeadamente de lulas (73,5%), choco (8,5%) e amêijoas (22,4%) e mexilhão (35,2%) (INE, 2020). Neste ano de 2019, as capturas provenientes da pesca do cerco atingiram 66 250 toneladas, tendo crescido 24,1%, devido essencialmente às maiores quantidades de peixes pelágicos devido ao aumento de cavala (39,2%), carapau (24,3%) e biqueirão (15,2%) em relação a 2018 (INE, 2020). Tal como em anos anteriores, manteve-se em 2019 a relevância da região Centro e do Algarve (cerca de 20,0%), seguidas pelas regiões de Lisboa, Norte e Açores em termos de desembarques de pescado (INE, 2020). Os valores médios das principais espécies (cavala, carapau, sardinha, biqueirão e moluscos, incluindo o polvo) capturadas ao longo dos cinco últimos podem observar-se na figura 1.3 (INE, 2020).

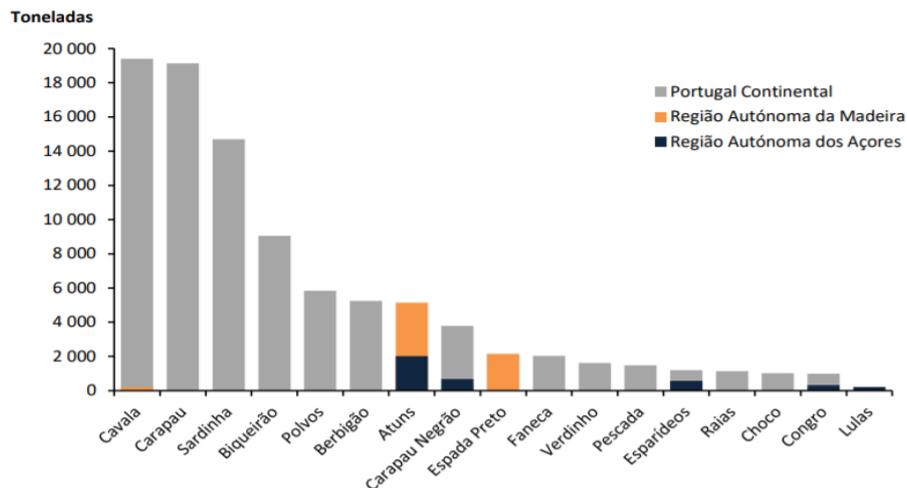


Figura 1.3. Valores médios das principais espécies de pescado capturadas em Portugal nos últimos cinco anos (INE, 2020).

Segundo o INE (2020), o pescado fresco destinado à comercialização é em Portugal desembarcado principalmente em cinco portos: Matosinhos, Figueira da Foz, Peniche, Sesimbra e Portimão, e vendido normalmente em lota, tendo o preço médio anual do pescado fresco ou refrigerado descarregado em lota registado um decréscimo de 5,3% em relação a 2018 (2,20 para 2,08 euros/kg). A venda nas lotas consiste num sistema de leilões tradicional ou online com participação direta ou em tempo real, onde todo o pescado é oferecido ao comércio em geral, seja ao grossista ou retalhista, assim como às indústrias de processamento, distribuição, restaurantes, hotelaria e supermercados, além do mercado exterior.

A produção em aquacultura atingiu mais de 12 500 toneladas (83,2 milhões de euros) em 2017, sendo a produção em águas salobras e marinhas a mais relevante (cerca de 94,4% da produção total). A amêijoia (32,8%) e o pregado (23,2%) foram as principais espécies produzidas, seguindo-se o mexilhão (14,5%), as ostras (10%), a dourada (8,8%) e o robalo (5,9%) (Figura 1.4). A produção nacional da aquacultura atingiu em 2018 cerca de 13 992 toneladas o que constituiu um aumento de 11,5% em relação a 2017 (INE, 2020).

A produção pela Indústria Transformadora da Pesca e Aquicultura em 2018 (informação mais recente disponível), de “congelados”, “secos e salgados” e “preparações e conservas” foi 220 mil toneladas (225 mil toneladas em 2017), tendo o total das vendas representado 94% da produção nacional (89% em 2017) e um acréscimo de faturação de 4,5%, relativamente aos resultados do ano anterior (INE, 2020).

Em 2019, as exportações de “Produtos da pesca ou relacionados com esta atividade” diminuíram face ao ano anterior, tendo, no entanto, a exportação de conservas e de congelados para diferentes países da EU e para os Estados Unidos da América, Suíça e Canadá sido muito relevante (INE, 2020)

As importações de “Produtos da pesca ou relacionados com esta atividade” diminuíram 0,6% em 2019, em relação ao ano anterior, totalizando 2 189,3 milhões de euros (moluscos menos 17,7%, crustáceos

menos 6,1% e peixe fresco menos 0,9%), mas a importação de pescado congelado, que é o grupo mais importante aumentou cerca de 0,1% (INE, 2020).

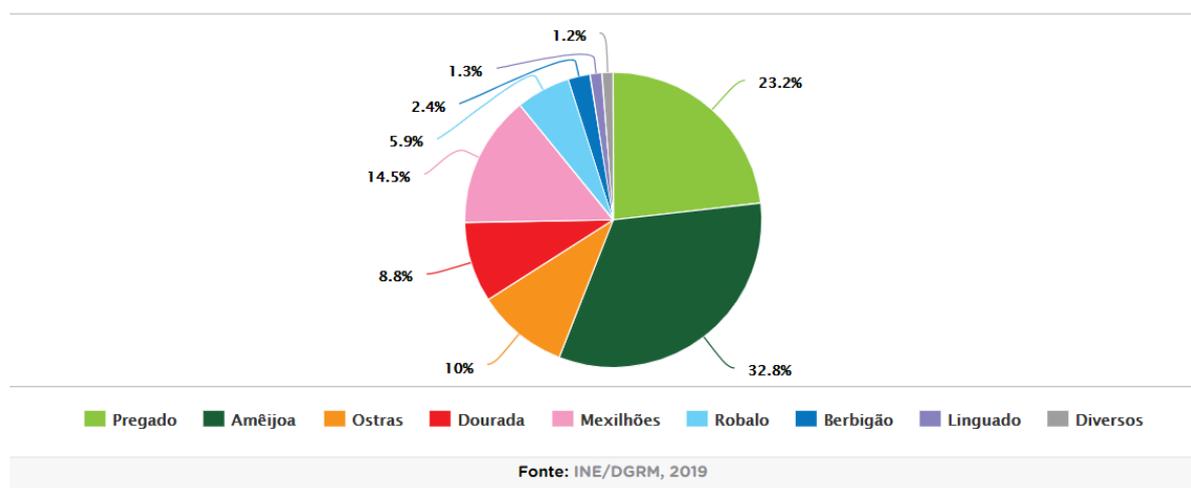


Figura 1.4. Distribuição da produção de aquacultura por espécies em 2017. (<https://rea.apambiente.pt/content/produ%C3%A7%C3%A3o-em-aquicultura>)

1.2 Espécies a estudar

1.2.1 Polvo comum (*Octopus vulgaris*)

O polvo comum (*Octopus vulgaris*) é um invertebrado marinho, pertencente ao filo Mollusca, classe Cephalopoda, família Octopoda e ao género Octopodidae. Esta espécie exibe como aspetos mais evidentes na sua morfologia externa um corpo mole, constituído pelo manto, cabeça e os braços com numerosas ventosas. O manto é uma estrutura musculosa que contém os órgãos internos (a massa visceral dos moluscos), assim como um funil musculoso orientável (caraterística dos cefalópodes), que permite a deslocação do animal por jatos de água. A cabeça localiza-se entre o manto e os braços, contendo um par de olhos laterais. Os oito braços são robustos e alongados, contendo duas fiadas de ventosas na parte interna. O polvo comum atinge um comprimento entre 30 e 80 cm, podendo alcançar 130 cm (De Kier e Smith, 1990), e é a espécie de polvo mais abundante na costa portuguesa, existindo praticamente ao longo de toda a sua extensão, desde a zona intertidal (zonas rochosas) até profundidades superiores a 150 m. Existe uma outra espécie, o chamado polvo cabeçudo (*Eledone cirrosa*) que exibe apenas uma fiada de ventosas nos braços e que é menos apreciada sob o ponto de vista gastronómico.

Segundo o INE (2019) o polvo tem sido uma das 6 espécies mais capturadas dos últimos 20 anos e a que mais receita tem gerado no mercado de primeira venda no período 2014-2018. Em 2018, a frota de pesca nacional capturou 6 774 toneladas de polvo, correspondente a 36,2% da quantidade total de moluscos capturados e a 5,3% do volume total de pescado descarregado em portos nacionais. O preço médio do polvo em 2018 (7,06 €/kg) atingiu o nível mais elevado das duas últimas décadas, crescendo a

um ritmo médio anual 2,4 vezes superior ao preço médio do total do pescado descarregado (Figura 1.5). Relativamente às espécies mais vendidas, esse crescimento também foi superior à sardinha (4,1 vezes), cavala (13,5 vezes), carapau (3,4 vezes), atum (1,8 vezes) e biqueirão (1,7 vezes). A receita da venda em lota atingiu 48 milhões de euros em 2018, cerca de 25% acima da receita gerada em 2017 e 28% superior à faturação média dos últimos 20 anos. De referir que quase 1/3 desta receita foi gerada pelos portos do Algarve.



(a)



(b)

Figura 1.5. Dois aspetos do polvo comum *Octopus vulgaris*. Fotos: (a) Beckmannjan [CC-BY-SA-3.0], via Wikimedia Commons, (b) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Octopus_vulgaris_2.jpg

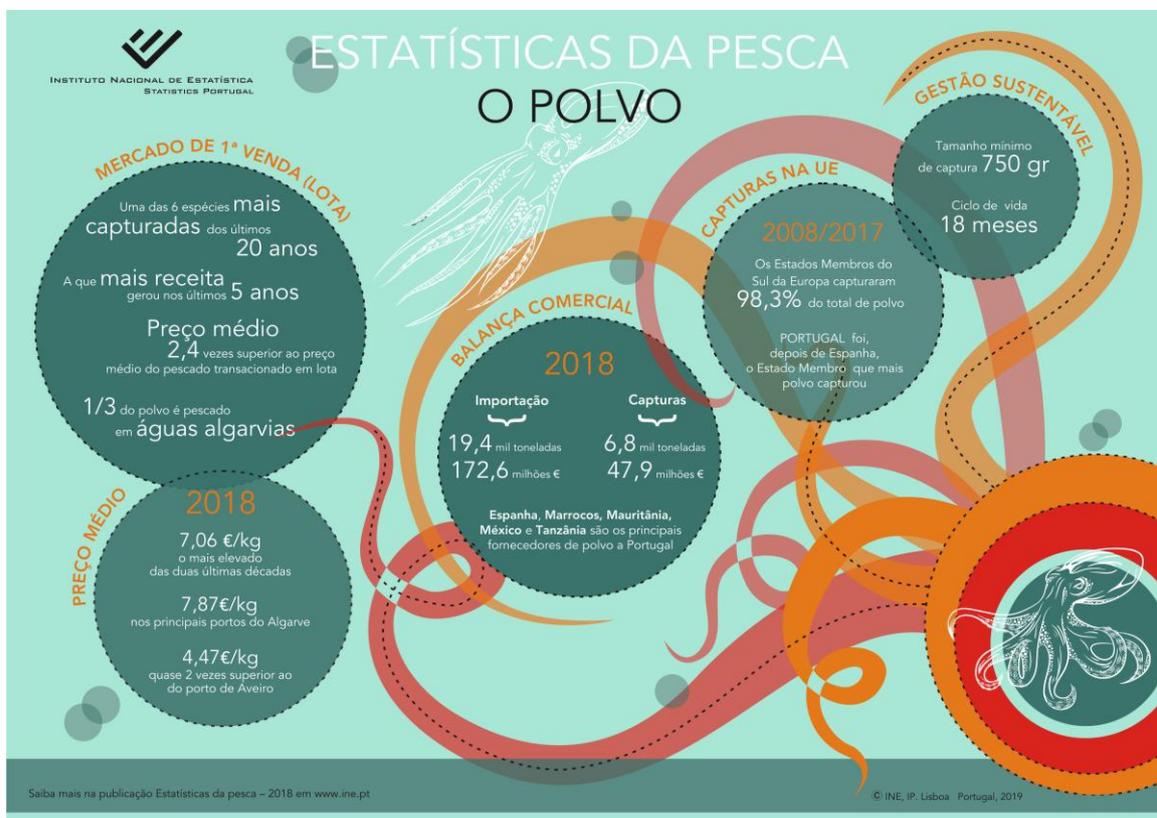


Figura 1.6. Infograma sobre o polvo com dados de 2018 (INE,2019).

A quantidade de polvo importada em 2018 (19,4 mil toneladas) foi superior em quase 3 vezes à quantidade capturada, com o valor da importação a atingir os 172,6 milhões de euros, mais de 3,6 vezes o valor obtido com as capturas de polvo em portos nacionais. A insuficiência das capturas de polvo é estrutural, verificando-se um crescimento médio de 4,6% das quantidades importadas entre 2013 e 2018 enquanto que as capturas em portos nacionais registaram uma variação média negativa de 12,1%. O polvo comum é comercialmente capturado em Portugal durante todo o ano com armadilhas de abrigo (alcatruzes) ou armadilhas de gaiola (covos), tanto como espécie-alvo como na forma de captura acessória de um conjunto diversificado de artes de pesca (detalhes na Figura 1.7).

O polvo proveniente dos diferentes segmentos da frota é sempre muito fresco e o da frota artesanal pode apresentar-se ainda vivo aquando do desembarque. Nestes últimos é possível reconhecer sinais de vitalidade tais como alterações da cor de acordo com o local onde se encontram ou reações de contração a estímulos exteriores. A cor é variável, mas predominam a castanho-clara ou escura e a violácea.

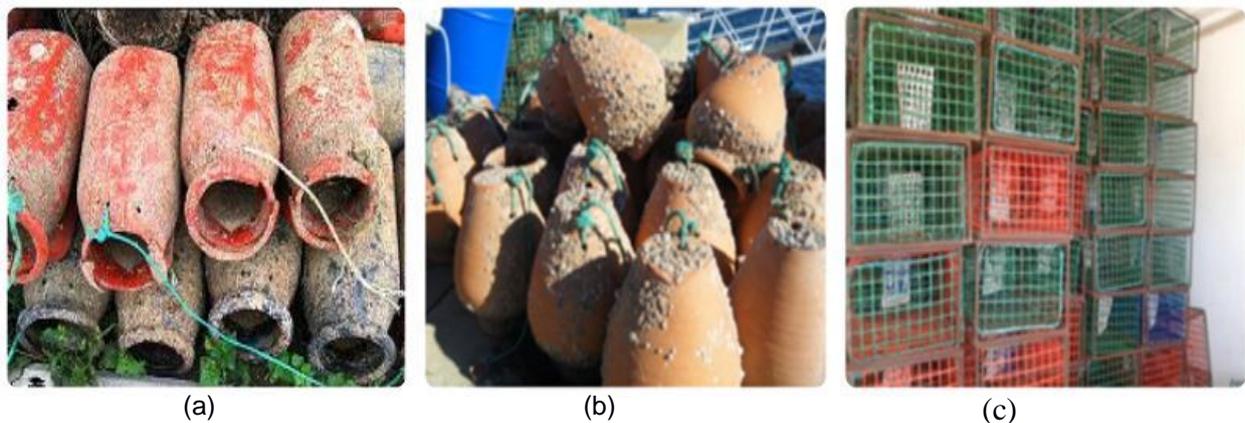


Figura 1.7. Alcatruzes de plástico (a) e barro (b) e covos de plástico (c) usados na captura de polvo.

O consumo de polvo seco era muito frequente em Portugal, mas atualmente tem vindo a generalizar-se a sua comercialização não só em inteiro e fresco, mas também em congelado e mesmo em conserva. Entra na confeção de múltiplos pratos que incluem tanto entradas como pratos principais, mas cozinhar polvo não é uma tarefa fácil. Existem muitas receitas para o cozinhar bem, mas o recurso à congelação é cada vez mais frequente como forma de o amaciar. A gastronomia nacional que inclui pratos de polvo é muito rica, merecendo destaque o arroz de polvo, o polvo à lagareiro e mais recentemente sob a forma de carpaccio.

1.2.2 Robalo (*Dicentrarchus labrax*)

O robalo legítimo (*Dicentrarchus labrax*), um peixe ósseo pertencente à família Moronidae e ao Género *Dicentrarchus*, é comum em todo o Mediterrâneo, mar Negro e no Atlântico Nordeste, da Noruega ao Senegal. É um predador voraz, alimentando-se de crustáceos, moluscos e peixes, que vive em águas costeiras, até uma profundidade de 100 m (normalmente no inverno), bem como em águas salobras de estuários e lagunas costeiras (no verão), podendo, ocasionalmente, ser encontrado em rios

(https://pt.wikipedia.org/wiki/Dicentrarchus_labrax). O robalo reconhece-se com facilidade pelo corpo esguio, bem proporcionado, pela boca terminal moderadamente protractil e a cor prateada no dorso e esbranquiçada na região ventral (Figura 1.8). Os peixes selvagens apresentam tamanhos muito variados, podendo atingir 15 kg e o tamanho mínimo legal de captura é 36 cm. Todavia, a comercialização mais frequente é de peixe de aquacultura que apresenta um tamanho médio muito uniforme (350 – 400 g).

Esta espécie apresenta duas barbatanas dorsais separadas; a primeira com 8 a 10 espinhos e a segunda com 1 espinho e 12 ou 13 raios moles. A barbatana anal é ligeiramente bifurcada e possui 3 espinhos e 10 a 12 raios moles. Tem o corpo coberto com pequenas escamas bem imbrincadas e uma linha lateral completa com 62 a 74 escamas, mas que não se estende na barbatana caudal. A pesca do robalo é regulamentada pela UE através da definição de tamanhos de captura e de malha, bem como por uma proibição da pesca de arrasto durante os períodos da desova nas áreas onde esta acontece. No entanto, não há quotas para a espécie e a pressão da pesca é ainda demasiado elevada.

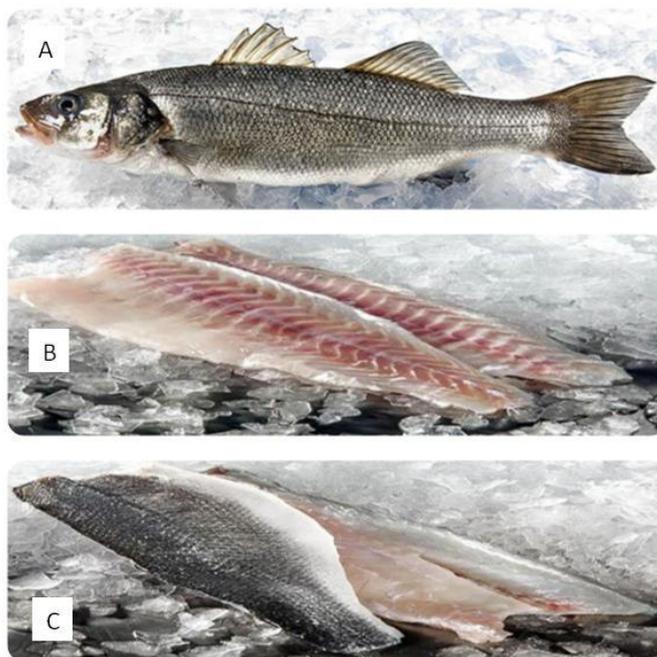


Figura 1.8. Robalo inteiro (A), filetes de robalo sem pele (B) e filetes de robalo com pele (C).

<http://guiapescado.wwf.pt/species/robalo/>

O robalo é uma espécie muito apreciada pelos consumidores do sul da Europa, e de alguns países da zona Norte da Europa como o Reino Unido, Alemanha, Holanda, Luxemburgo e Bélgica. Devido a uma menor disponibilidade e ao elevado custo desta espécie capturada no estado selvagem, a produção em aquacultura tornou-se uma importante alternativa para garantir uma maior disponibilidade no mercado. A aquacultura assegura assim uma parte muito substancial da produção de robalo, sendo a União Europeia (UE) o maior produtor mundial (principalmente Grécia e Espanha), seguida do Egito, o segundo maior produtor. Em 2015, Portugal produziu cerca de 297 toneladas, sendo a produção fundamentalmente semi-intensiva em esteiros (antigas salinas) o principal método utilizado (INE, 2017). As zonas de produção localizam-se principalmente nas Rias de Aveiro, Alvor, Formosa e nos Estuários do Mondego e Guadiana (INE, 2017). O robalo é comercializado na Europa inteiro, em filetes com e sem pele e ainda

sob a forma de porções ou espetadas. Em Portugal o robalo é comercializado sobretudo inteiro em fresco, sendo mais preferidos os exemplares de tamanho dose ou com mais de 1 kg.

Dada a cor da carne, a firme textura e sabor delicado e a disponibilização de várias apresentações - filetes com ou sem pele e postas- pode contribuir para a satisfação de novos mercados e para estimular a expansão da aquacultura desta espécie (http://www.seafish.org/media/1403318/_2_sea_bass_rsg-cocker_04-15kg.pdf).

1.3 Composição bioquímica e nutricional dos produtos da pesca e aquacultura

Entre os alimentos disponíveis para alimentação humana destacam-se os produtos da pesca e da aquicultura, uma vez que integram uma grande diversidade de espécies, apresentam alto valor nutricional e, em regra, são de fácil digestão. Além disso, são considerados alimentos de eleição para um regime alimentar equilibrado e saudável. Os produtos da pesca e aquicultura, também designados por pescado, definem-se como sendo “todos os animais ou partes de animais marinhos ou de água doce, incluindo as suas ovas e leitugas, com exclusão dos mamíferos aquáticos, das rãs e dos outros animais aquáticos abrangidos por regulamentação comunitária específica”, ou seja, incluem apenas os peixes, crustáceos e moluscos.

À semelhança da maioria dos alimentos de origem animal, os constituintes maioritários do pescado são a água, as proteínas e os lípidos e, dentro dos minoritários, destacam-se os sais minerais, vitaminas e nalgumas espécies o glicogénio (Nunes et al., 2008). O quadro 1.1 ilustra a composição química de algumas espécies de pescado, mostrando a variação dos principais constituintes.

Quadro 1.1. Composição química aproximada e valor energético de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal.

Espécie	Energia	Água	Proteína	Gordura	Minerais
	(kcal/kJ/100 g)				
Polvo	33/306	83,1	15,6	1,2	0,9
Amêijoia	58/243	81,1	11,7	0,9	1,0
Ostra	81/339	82,1	09,4	2,3	1,2
Camarão	77/322	79,2	17,6	0,6	1,5
Pescada	75/315	81,1	17,0	0,8	1,1
Bacalhau	76/317	80,0	17,8	0,5	1,4
Carapau	105/439	75,6	19,7	2,9	1,4
Robalo	116/486	75,3	19,8	3,5	1,2
Dourada	167/699	68,9	19,7	9,8	1,4
Sardinha	221/926	63,4	18,4	16,4	1,7
Salmão	262/1096	60,5	16,2	21,9	1,3

Fonte: Nunes *et al.*, 2008.

A percentagem dos constituintes que compõem a parte edível do pescado varia em função de fatores endógenos nomeadamente espécie, sexo, idade e ciclos migratórios e exógenos como a alimentação e o habitat. Estas características verificam-se nas espécies selvagens de ambientes dulçaquícolas ou marinhos (Huss, 1995). No caso de espécies de aquacultura pode também observar-se alguma variação química, todavia neste caso a composição química é em muito determinada pela composição dos ingredientes das rações e, em regra, pode ser mais facilmente prevista.

1.3.1 Água

A parte edível do pescado é composta principalmente por água cujo valor pode variar entre 50 e 85 %. As espécies magras apresentam um teor superior ao das espécies gordas, verificando-se que este varia na razão inversa do teor lipídico (para a maior parte das espécies a soma destes dois constituintes é cerca de 80 %, verificando-se em muitas a relação $A+L=98,8 - 1,01 P$, entre as percentagens dos constituintes: água (A), lípidos/gorduras (L) e proteína (P) (Sikorski et al., 1990). Esta variação é mais acentuada na época de postura, na qual ocorre uma depleção das reservas energéticas. Durante este período também se observa uma diminuição do conteúdo proteico e, conseqüentemente, um aumento na percentagem de água nos tecidos. É de referir que nalguns casos é possível estimar a condição em que se encontra o pescado através do teor de humidade (Huss, 1995). A água tem várias funções no metabolismo das várias espécies, assim para além de meio aquoso para as várias reações bioquímicas, é um elemento estrutural e um meio de transporte extracelular e de excreção. Após a captura é em grande parte responsável pela alteração do músculo durante o processo de conservação não só do pescado fresco como dos processados, uma vez que influencia profundamente a estrutura, aspeto e o sabor e textura (Nunes et al., 2008). Efetivamente, a água existente no músculo e noutros tecidos afeta a conformação e reatividade das proteínas e está envolvida em interações proteínas-lípidos-solutos (Sikorski et al., 1990).

1.3.2 Proteínas e outros compostos azotados

Os compostos azotados que se encontram na parte muscular dos produtos da pesca são constituídos, essencialmente, por proteínas (80 a 90%) e substâncias azotadas não proteicas (Nunes et al., 2008). As proteínas são um dos principais constituintes dos produtos da pesca, apresentando valores que variam entre 8 e 25% (Lourenço et al, 2001; Nunes et al., 2008). Na maior parte dos peixes os teores situam-se entre 16 e 21 % ao passo que os moluscos e crustáceos apresentam valores ligeiramente inferiores (Bandarra et al., 2004). Quando comparado com os lípidos e a água, o teor em proteína é geralmente mais estável. Numa mesma espécie, este teor não apresenta diferenças substanciais durante o ciclo de vida. No entanto, em alguns casos, verifica-se que a maturação das gónadas ou a privação de alimento por longos períodos provoca uma diminuição do teor proteico (Huss, 1995).

As proteínas são moléculas de elevada massa molecular, constituídas basicamente por carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto, cujas unidades básicas são os aminoácidos. Podem incluir também alguns minerais como fósforo, enxofre e ainda ferro, cobre e magnésio em menor quantidade. A maioria das proteínas pode ser do tipo fibroso ou do tipo globular.

As proteínas podem organizar-se em três grupos de acordo com as suas características físico-químicas:

a. Proteínas miofibrilares: Representam 70 a 80% do conteúdo proteico total do pescado e são responsáveis pela textura características do músculo e pela capacidade de retenção da água, aspetos muito importantes para a indústria. Consoante a sua função fisiológica classificam-se em contráteis e reguladoras. As primeiras, que são os principais constituintes das miofibrilas estão diretamente envolvidas nos ciclos de contração-relaxamento muscular no caso dos vertebrados, incluem a actina (principal componente dos filamentos finos) e a miosina (principal componente dos filamentos grossos). No caso dos cefalópodes a organização das miofibrilas é diferente da dos vertebrados uma vez que se encontram dispostas helicoidalmente e são estriadas obliquamente, facto que facilita contrações musculares muito mais rápidas. Acresce ainda que estes invertebrados têm uma proteína característica, a paramiosina, que para além de uma função estrutural está envolvida na manutenção prolongada da contração muscular com pequeno gasto energético (Sikorski, 1994). As proteínas reguladoras participam de forma indireta na contração muscular e dentre estas destacam-se a tropomiosina e a troponina;

b. Proteínas sarcoplasmáticas: Representam 25 a 30% do valor proteico global. A maior parte é constituída por enzimas, salientando-se a creatina quinase, aldolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que estão relacionadas com vários processos fisiológicos (Natagawa et al., 1988) e incluem a mioglobina e a globulina;

c. Proteínas do tecido conjuntivo: Representam cerca de 3% do conteúdo proteico total nos peixes ósseos e 10 % nos peixes cartilagíneos e incluem, nomeadamente, o colagénio, reticulina e a elastina, (Huss, 1995; Horton et al., 1996).

As proteínas são formadas por blocos de moléculas denominados aminoácidos, compostos por um grupo amino (-NH₂), um grupo de ácido carboxilo (-COOH) e por uma cadeia lateral distinta que vai diferenciar cada aminoácido. Os aminoácidos, quanto à necessidade de os veicular pela dieta, podem ser classificados como essenciais (AAE), aqueles que o organismo humano não pode sintetizar e, portanto, têm obrigatoriamente de ser fornecidos através da dieta e não-essenciais (AANE), quando podem ser sintetizados pelo organismo humano. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007) a histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina são AAE, enquanto que os ácidos aspártico e glutâmico, asparagina, alanina, serina, cisteína, tirosina, glicina, arginina, glutamina e prolina são AANE. Contudo, alguns AANE, tais como a cistina, tirosina, glicina, arginina, glutamina ou prolina, podem tornar-se essenciais em determinadas condições patológicas ou fisiológicas (por exemplo lactação, gravidez, recuperação de queimaduras e de outras lesões, bem como situações de infeção), em que as necessidades metabólicas em aminoácidos superem a capacidade de biossíntese. Por este motivo, estes aminoácidos, podem ser denominados como aminoácidos condicionalmente indispensáveis (WHO, 2007) (Quadro 1.2).

Sob o ponto de vista nutricional, o perfil de aminoácidos do pescado é bastante semelhante ao encontrado noutros produtos ricos em proteínas. Assim, as proteínas dos produtos da pesca possuem todos os aminoácidos essenciais para o organismo, tais como, a lisina e a metionina (Huss, 1995), todavia, os teores podem variar em função de fatores endógenos e exógenos (Quadro 1.2).

Quadro 1.2. Composição de aminoácidos essenciais (g) por 100 g de parte edível de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal.

Aminoácidos g/100 g*	Polvo	Amêijoia	Camarão	Dourada	Robalo
Fenilalanina	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8
Histidina	0,3	0,3	1,7	0,9	1,1
Isoleucina	0,5	0,6	0,7	0,9	1,1
Leucina	1,0	0,9	1,5	1,5	1,7
Lisina	0,9	1,0	0,4	1,8	2,0
Metionina	0,3	0,1	0,6	0,5	0,5
Triptofano	0,1	na	na	0,1	na
Valina	0,5	0,6	0,8	1,0	1,2

*Os valores de treonina não estão incluídos: na: não analisado. Fonte: Adaptado de Narcisa et al., 2004 e Nunes et al., 2008.

Os compostos que constituem o azoto não proteico incluem, entre outros, péptidos, aminoácidos livres, óxido de trimetilamina, trimetilamina, purinas e ureia e encontram-se principalmente no sarcoplasma. Estes constituintes não proteicos representam 9 a 18% do azoto presente no músculo dos peixes teleósteos, 33 a 38% do azoto presente no músculo dos peixes elasmobrânquios e 20 a 25% do azoto muscular dos moluscos e crustáceos (Nunes et al., 2008; Huss, 1995). Estes compostos desempenham um importante papel não só no desenvolvimento das características sensoriais, mas também nos mecanismos de degradação pelo que a sua discriminação e quantificação são muito relevantes na avaliação do grau de frescura e na evolução da perda de qualidade quer em fresco quer durante o processamento e conservação (Huss, 1995). Assim, a histidina livre pode ser descarboxilada a histamina por ação dos microrganismos deteriorantes, sempre que a temperatura de conservação do pescado permita o seu crescimento. Os microrganismos deteriorantes podem igualmente reduzir o óxido de trimetilamina, composto envolvido na regulação da pressão osmótica, a trimetilamina, originando compostos de cheiro desagradável.

1.3.3 Lípidos

Os lípidos, também designados por gordura, são um grupo muito diversificado de compostos hidrofóbicos, cujas unidades básicas são os ácidos gordos. Estes compostos podem ser classificados como: (a) Lípidos não polares (também designados por neutros), que compreendem os acilgliceróis (mono-, di-, e tri-) principalmente os triacilgliceróis (formados por cadeias de ácidos gordos esterificados com uma molécula de glicerol), ácidos gordos livres, colesterol e outros esteróis; (b) Lípidos polares, nomeadamente os fosfolípidos (semelhantes aos triacilgliceróis mas com um grupo fosfórico em substituição de um ácido gordo), que pelo facto de participarem na formação das membranas celulares, são também denominados lípidos estruturais.

Em função do teor lipídico na parte edível, o pescado é classificado como magro, quando o teor em lípidos é inferior a 2%, semi-gordo quando a percentagem lipídica varia entre 2% e 5% e gordo quando a percentagem de gordura excede 5%, pelo menos numa época do ano (Quadro 1.4). O bacalhau e a pescada, os cefalópodes, caso do polvo, e os moluscos bivalves são exemplos de espécies magras e do conjunto das espécies gordas destacam-se, entre outros, os pequenos peixes pelágicos como a sardinha, sarda e cavala e a enguia. De entre as espécies semi-gordas são de salientar os atuns, o espadarte e o peixe-espada-branco (Bandarra et al., 2004; Huss et al., 2004).

Os peixes magros possuem as maiores reservas lipídicas no fígado principalmente sob a forma de triacilgliceróis e uma pequena fração no músculo sob a forma de fosfolípidos. Nos peixes gordos os lípidos encontram-se maioritariamente ao nível do músculo e numa camada lipídica subcutânea; por vezes acumulam-se também ao redor das vísceras, formando uma camada mais ou menos evidente conforme a espécie (Bandarra et al., 2004).

Quadro 1.3. Composição de gordura total, total de PUFA, EPA e DHA em g/100 g na parte edível de algumas espécies de pescado comercializados em Portugal.

Espécie	Gordura total (g/100 g)	Total de ácidos gordos polinsaturados* (g/100 g)		Principais ácidos gordos ómega 3 (g/100 g)	
		Ómega 3	Ómega 6	EPA*	DHA*
Polvo	1,2	0,12	0,01	0,2	0,3
Camarão	0,6	0,05	0,01	0,1	0,1
Pescada	0,8	0,55	0,03	0,1	0,2
Bacalhau	0,5	0,21	0,02	0,1	0,2
Carapau	2,9	0,21	0,01	0,2	0,6
Robalo	3,5	0,26	0,51	0,3	0,6
Dourada	9,8	1,19	0,51	0,4	1,2
Sardinha	16,4	2,2	0,46	1,4	3,3
Salmão	21,9	4,3	0,76	1,2	1,8

* PUFA- ácidos gordos polinsaturados, EPA-ácido eicosapentaenóico e DHA-ácido docosahexenóico, Fonte: Nunes et al., 2008.

Os ácidos gordos, a unidade mais simples dos lípidos, são compostos orgânicos simples formados por carbono, hidrogénio e oxigénio e que num dos extremos da cadeia alquilo apresentam um grupo carboxílico (-COOH), que lhe confere um carácter ácido, e no extremo oposto tem um grupo metilo (-CH₃) não funcional. Estes compostos podem ser classificados de acordo com o tamanho da sua cadeia carbonada e com o número de ligações duplas (insaturações) que apresentam. Assim, os ácidos gordos podem ser de cadeia curta (4 a 6 átomos de carbono), média (8 a 12 átomos de carbono), longa (14 a 20 átomos de carbono) ou muito longa (20 ou mais átomos de carbono) (Nunes et al., 2008). De uma forma geral, os ácidos gordos encontrados nos produtos da pesca, apresentam um número par de átomos de

carbono, tipicamente entre 14 e 24, uma configuração cis na sua estrutura e o seu perfil e quantidade variam de espécie para espécie (Nunes et al., 2008). O perfil dos ácidos gordos do pescado é variável pois, tal como os restantes constituintes, este é influenciado por vários fatores como o estado de maturação sexual, a temperatura, a salinidade e o alimento disponível (Bandarra et al., 2004; Nunes et al., 2008).

Quanto ao número de insaturações, os ácidos gordos dividem-se em ácidos gordos saturados (SFA), quando não apresentam ligações duplas carbono-carbono, e ácidos gordos insaturados, quando apresentam tais ligações. De acordo com o número de insaturações, os ácidos gordos podem ser monoinsaturados (só uma ligação dupla, MUFA) ou polinsaturados (mais do que uma ligação dupla, PUFA) (Nunes et al., 2008). Os ácidos gordos insaturados podem ainda ser classificados de acordo com a posição em que se encontra a primeira insaturação a partir do grupo metilo terminal da molécula (carbono ω ou n). Por exemplo, os ácidos gordos da família $\omega 3$ serão aqueles que apresentem a primeira ligação dupla no terceiro carbono contado a partir da extremidade distal da molécula (Nunes et al., 2008). Os ácidos gordos podem ainda dividir-se em ácidos gordos não essenciais, os que o organismo consegue sintetizar, e ácidos gordos essenciais, os que por não poderem ser sintetizados pelo organismo humano e serem indispensáveis para o seu funcionamento, têm obrigatoriamente de ser fornecidos pela dieta. O organismo humano não consegue sintetizar ácidos gordos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, uma vez que não possui enzimas dessaturases capazes de introduzir ligações duplas entre os carbonos 3-4 e 6-7. No entanto, o organismo humano consegue converter os ácidos linoleico (18:2 $\omega 6$) e α -linolénico (ALA, 18:3 $\omega 3$) noutros importantes ácidos gordos, nomeadamente o araquidónico (20:4 $\omega 6$), a partir do ácido linoleico, e os ácidos eicosapentaenóico ou EPA (20:5 $\omega 3$) e docosahexaenóico ou DHA (22:6 $\omega 3$), a partir do ácido α -linolénico, através de reações de alongamento e dessaturação da cadeia (Nunes et al., 2008). Assim, os ácidos linoleico e α -linolénico são considerados ácidos gordos essenciais.

O perfil de ácidos gordos nos produtos da pesca varia consideravelmente de acordo com o estado de maturação, a temperatura, a salinidade e a disponibilidade alimentar, fatores estes que, por sua vez, são influenciados pela área geográfica e pela estação do ano (Bandarra et al., 2001). Vários autores (por exemplo Tilami e Sampels, 2017) mostram que valores mais baixos da temperatura da água resultam, geralmente, num menor teor de SFA e numa maior concentração de ácidos gordos insaturados e, por seu lado, a salinidade tem também evidenciado que pode não só afetar o teor em gordura total (sendo este, em regra superior quando a salinidade for mais elevada), mas também o perfil em ácidos gordos.

De uma forma geral, o pescado possui um teor de ácidos gordos saturados inferior ao dos insaturados (Nunes et al., 2008) e até 40% de ácidos gordos de cadeia longa (14-22 átomos de carbono) altamente insaturados), contrariamente aos lípidos dos mamíferos (Huss, 1995).

Na gordura dos produtos da pesca, tal como na gordura da maioria dos animais, os SFA predominantes são o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0), embora o mirístico (14:0) seja também encontrado. Já em relação aos MUFA, os mais abundantes nos lípidos do pescado são, normalmente, o ácido palmitoleico (16:1 $n 7$) e o ácido oleico (18:1 $n 9$). No entanto, também é frequente encontrar os ácidos gordos 20:1 $n 9$ e 22:1 $n 11$. Por outro lado, os principais PUFA do pescado são o ácido araquidónico (20:4 $n 6$), ácido linoleico (18:2 $n 6$), EPA (20:5 $n 3$), DHA (22:6 $n 3$) e ácido α -linolénico (18:2 $n 3$) (Nunes et al., 2008). Particularmente importantes são os $n 3$ PUFA, especialmente o EPA e DHA, que em muitos casos chegam

a representar mais de 85% do total de PUFA (Nunes et al., 2008). Na figura 1.8, pode-se observar a estrutura química dos ácidos gordos EPA e DHA.

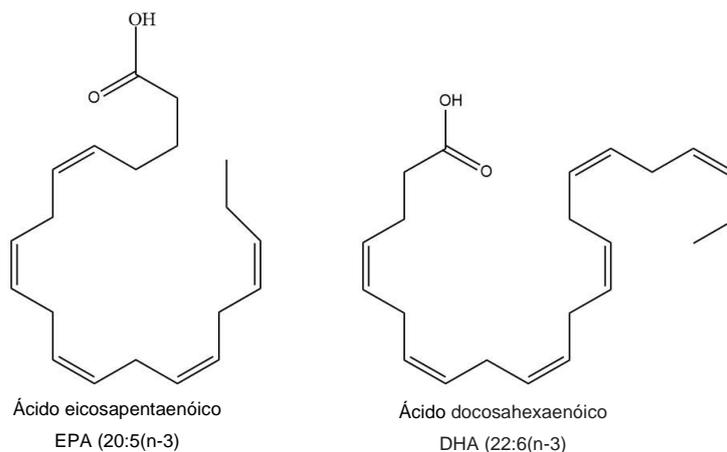


Figura 1.9. Estruturas químicas dos dois principais ácidos gordos presentes no pescado (Nunes et al., 2008).

1.3.4 Minerais

A parte edível do pescado apresenta vários minerais como se ilustra no Quadro 1.4 e, de um modo geral, o seu teor varia entre 0,8 e 2,0%. As diferenças nos teores dos elementos encontrados na parte edível são atribuídas não só a fatores intrínsecos, mas também a fatores extrínsecos (Nunes et al., 2008). Como exemplo destes fatores salienta-se a espécie e o seu ciclo biológico, idade, tamanho, sexo e estado de maturidade sexual, bem como fatores ecológicos, nomeadamente a época do ano, área geográfica, tipo de alimento e disponibilidade do nutriente, temperatura e salinidade da água (Nunes et al., 2008). No pescado de origem marinha, o teor em minerais reflete a composição do alimento disponível neste meio, sendo este teor maior do que em pescado de água doce, enquanto que no pescado de aquacultura, o teor em minerais é influenciado pela composição do alimento que lhe é fornecido (Nunes et al., 2008).

Do ponto de vista biológico, os minerais dividem-se em duas categorias: essenciais e não essenciais. Os essenciais são conhecidos por serem utilizados em pequenas concentrações no desempenho de funções metabólicas vitais dos diferentes organismos, ao contrário dos não essenciais, para os quais, até hoje, não se conhece nenhuma função metabólica e que podem ser tóxicos mesmo em concentrações baixas, caso do mercúrio, cádmio e chumbo (Belitz & Grosch, 1999; Çelik et al., 2004). Em grande número de espécies verifica-se a seguinte ordem decrescente de concentrações: potássio (K)>fósforo (P)>sódio (Na)>magnésio (Mg)>cálcio (Ca)>zinco (Zn)>ferro (Fe) (Nunes et al., 2008).

Alguns produtos da pesca apresentam importantes teores de selénio (Se) (10 a 100 mg/100 g) e iodo (I) (entre 10 e mais de 500 µg/100 g). O Se encontra-se frequentemente presente sob a forma de selenatos. O iodo existe nos produtos da pesca na forma de sais de iodeto e iodato ou ligado aos aminoácidos treonina e tirosina (Nunes et al., 2008).

Alguns estudos mostram que o selênio, quando fornecido pelo pescado, fica mais biodisponível do que quando fornecido por outros alimentos (Tilami e Sampels, 2017). Por outro lado, o selênio tem capacidade para reduzir a toxicidade do metilmercúrio (MeHg), um dos contaminantes veiculados pelo pescado. Os mecanismos de atuação do selênio são diversos, podendo alterar o padrão de distribuição do mercúrio pelos diferentes órgãos e tecidos, competir por locais de ligação entre mercúrio (Hg) e Se, formar complexos Hg-Se, converter formas tóxicas de mercúrio em formas menos tóxicas e prevenir danos oxidativos (Marmelo et al., 2020).

Quadro 1.4. Valores médios de alguns minerais em mg/100 g de parte edível de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal.

Espécie	Minerais (mg/100 g)						
	K	P	Na	Mg	Ca	Zn	Fe
Polvo	236	165	259	43	13	1,3	0,7
Ostra	168	162	106	22	8	16,6	5,1
Camarão	179	150	194	30	87	0,3	1,8
Pescada	408	219	69	26	15	0,7	0,5
Bacalhau	362	200	65	26	15	0,5	0,3
Carapau	403	263	80	33	69	1,2	1,2
Robalo	346	234	95	38	52	1,2	0,4
Dourada	383	252	59	28	15	0,8	0,4
Sardinha	367	314	65	31	72	1,6	1,0

Fonte: Nunes *et al.*, 2008.

1.3.5 Vitaminas

Assim como os minerais, as vitaminas também apresentam variações de espécie para espécie e, dentro de uma mesma espécie, ao longo do ano e de tecido para tecido (Quadro 1.5). De acordo com a sua solubilidade, as vitaminas podem dividir-se em lipossolúveis, grupo constituído pelas vitaminas A, D, E e K, e hidrossolúveis, grupo que inclui vitaminas B1, B2, B6, B12, C, niacina, biotina, ácido pantoténico e folato (Gallenguer, 2008). Uma vez que não são sintetizadas pelo Homem, as vitaminas têm de ser fornecidas pelos alimentos. Constituem exceção a esta regra a vitamina D, que pode ser sintetizada na pele após exposição ao sol, a niacina, que pode ser sintetizada a partir do triptofano e as vitaminas K e biotina que podem ser sintetizadas pelas bactérias da flora intestinal (Afonso e Almeida, 1997).

De um modo geral, o pescado constitui uma boa fonte de vitaminas lipossolúveis, apresentando teores superiores aos dos animais terrestres, especialmente no caso dos peixes com um teor de gordura mais elevado (Huss, 1995; Venugopal & Shahidi, 1996). As vitaminas A, D e E encontram-se também presentes na parte edível do pescado, apresentando, no entanto, concentrações geralmente mais

elevadas nas vísceras, especialmente no fígado (Rittenschober et al., 2013). A elevada concentração destas vitaminas no fígado de determinados peixes fez com que alguns óleos de peixe, especialmente o óleo de fígado de bacalhau, tenham sido muito recomendados no século passado como suplemento alimentar, sobretudo para as crianças (Afonso e Almeida, 1997). O pescado é igualmente considerado uma boa fonte de vitaminas hidrossolúveis, com exceção da vitamina C. Estas vitaminas estão principalmente presentes no músculo, embora se possam encontrar também na pele, fígado e intestino. O pescado apresenta normalmente níveis mais elevados das vitaminas B1, B2, B6, niacina e ácido pantoténico, encontrando-se as outras em quantidades mais baixas (Tilami e Sampels, 2017; Belitz et al., 2009, Nunes et al., 2008; Venugopal e Shahidi, 1996; Murray e Burt, 1983). No pescado de aquacultura, o teor em vitaminas assim como de outros elementos, reflete a composição do alimento que lhe é fornecido.

Quadro 1.5. Teores médios de vitaminas em mg ou µg/100 g de parte edível de algumas espécies de pescado comercializadas em Portugal.

Espécies	Vitaminas							
	µg/100 g			mg/100 g				
	A	D	B12	Folatos	E	B1	B2	B6
Polvo	3,0	0,7	1,3	12,0	0,7	0,02	0,04	0,07
Camarão	0,0	0,0	2,1	9,0	0,7	0,03	0,01	0,05
Pescada	10,0	1,4	0,7	18,0	0,5	0,07	0,04	0,06
Bacalhau	3,8	4,5	1,0	8,1	0,3	0,05	0,07	0,07
Carapau	15,0	4,1	5,7	15,0	0,4	0,20	0,20	0,36
Robalo	36,0	5,0	n.a.	9,5	0,2	0,30	0,10	0,50
Dourada	11,0	12,0	4,8	24,0	0,8	0,20	0,08	0,36
Sardinha	47,0	21,0	10,0	15,0	0,7	0,01	0,08	0,57
Salmão	33,0	11,0	1,9	10,0	4,0	0,18	0,04	0,45

Fonte: Nunes *et al.*, 2008. n.a. - não analisado.

1.3.6 Hidratos de carbono

O conteúdo de hidratos de carbono no músculo de peixes em geral é muito baixo, com valores normalmente inferiores a 0,5% (Nunes et al., 2008), podendo chegar até 1% (Ogawa e Maia, 1999). Nos bivalves, de um modo geral, o teor oscila entre 2 e 4% (Nunes et al., 2008) e segundo Ogawa e Maia (1999) as vieiras, mexilhões, ostras e caramujos podem atingir mais de 5%. As pequenas reservas de hidratos de carbono dos peixes encontram-se depositadas fundamentalmente no músculo esquelético e no fígado, sob a forma de polissacáridos glicogénicos. O glicogénio encontra-se sob a forma de pequeníssimos grãos nos discos anisotrópicos (músculo escuro) das miofibrilas e no sarcoplasma das

células musculares. No músculo do peixe encontram-se também monossacáridos numa proporção reduzida (cerca de 0,006%) e produtos de cisão de ácidos nucleicos (ribose) (Nunes et al., 2008).

O músculo dos peixes é constituído por fibras curtas, organizadas em segmentos separados por finas camadas de tecido conjuntivo e não por fibras longas, organizadas longitudinalmente e envolvidas por camadas mais espessas de tecido conjuntivo como nos outros vertebrados (Belitz et al., 2009) (Figura 1.10). Assim, a disposição das fibras musculares, a menor quantidade de tecido conjuntivo e a fácil gelatinização do colagénio, tornam o peixe mais tenro do que a carne. Os miotomas (ou miótomos) estão ligados entre si por uma camada fina de tecido conjuntivo que se designa por miosepto ou miocomata. Os miotomas são compostos por fibras musculares paralelas que apresentam uma disposição aproximadamente perpendicular ao miosepto (Nunes et al., 2008).

Ao longo da linha lateral encontra-se uma faixa de músculo castanho-escuro, designada por músculo escuro, com características bioquímicas e histológicas diferentes do músculo branco cuja percentagem relativa à massa muscular do peixe varia grandemente com a espécie. Em regra, nos peixes chatos a quantidade de músculo escuro é residual enquanto que nos pelágicos, que têm uma atividade natatória, a percentagem pode atingir 25 % do volume total do tecido muscular. Nos peixes designados genericamente por demersais e na dourada e robalo de aquacultura a percentagem deste músculo é intermédia, podendo apresentar pequenas variações intraespecíficas na percentagem e na tonalidade (Nunes et al., 2008).

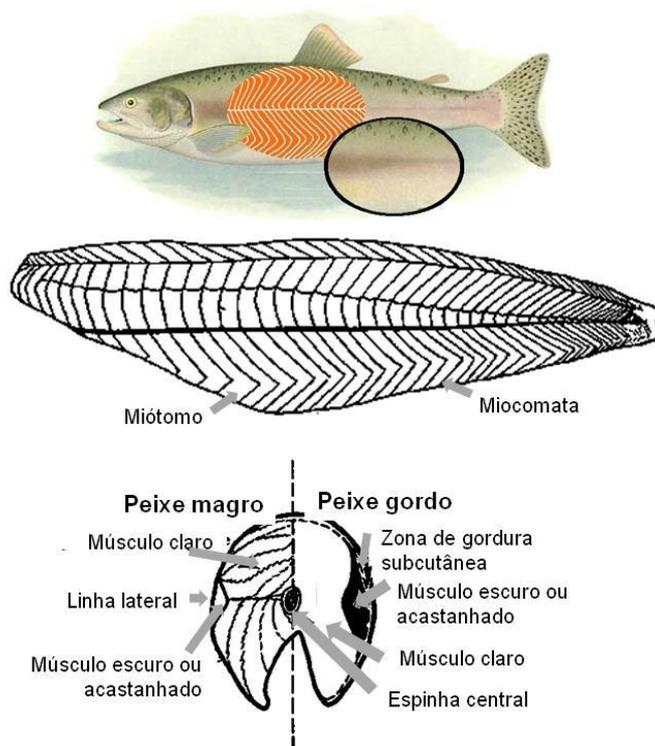


Figura 1.10 Aspeto da distribuição dos miótomos, miocomata e do músculo claro e escuro em salmão (adaptado de Murray e Burt, 1991).

A estrutura muscular dos cefalópodes é muito distinta da dos peixes. No caso das lulas, a sua principal parte edível, o manto, é constituído por cinco camadas de tecidos, representando a camada média cerca de 98 % da espessura total. Estas camadas apresentam diferenças nas suas propriedades químicas e

físicas, em particular, na resposta aos tratamentos térmicos, pelo que o tempo de cozedura, a temperatura e o método de aquecimento influenciam a textura do produto cozinhado (Nunes et al.,2008). A massa muscular dos braços dos polvos está envolvida por uma bainha de tecido conjuntivo e é constituída por fibras longitudinais e transversais e por um sistema complexo de fibras oblíquas com diferentes orientações (Figura 1.11).

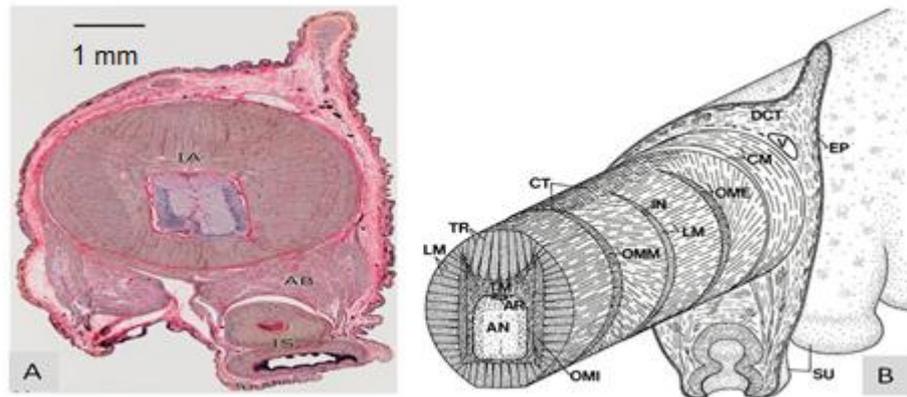


Figura 1.11. Detalhes da musculatura do braço de polvo *Octopus vulgaris*. A: Corte transversal do braço do polvo, mostrando as três principais subdivisões do músculo do braço: (IA) músculo do braço; (IS) músculo da ventosa e (AB) músculo que liga o braço à ventosa. B: Diagrama esquemático do braço do, mostrando a disposição tridimensional das fibras musculares e fibras do tecido conjuntivo. AN, cordão nervoso axial; AR, artéria; CM, camada muscular circunferencial; CT, tecido conjuntivo; DCT, tecido conjuntivo dérmico; EP, epiderme; IN, nervo intramuscular; LM, fibras musculares longitudinais; OME, camada muscular oblíqua externa; OMI, camada muscular oblíqua interna; OMM, camada muscular oblíqua mediana; SU, ventosas adesivas; TM, fibras musculares transversais; TR; trabéculas; V veia. (Adaptado de Kier e Smith, 1990).

1.4 Alterações da qualidade dos produtos da pesca e aquicultura

A deterioração do pescado resulta do efeito combinado de reações de oxidação lipídica, reações químicas resultantes da atividade de enzimas endógenas, alterações físicas e do crescimento bacteriano (Oehlenschläger e Rehbein, 2009). Esta cadeia de reações autolíticas e bioquímicas ocorre imediatamente após a morte de forma progressiva e gradual. Na fase que precede a instalação do rigor mortis, ou seja, logo após a morte, o músculo do pescado que contém glicogénio, fosfocreatinina e adenosina trifosfato (ATP) apresenta-se flexível e elástico. Este período de pré-rigor é de curta duração (em regra algumas horas), e pode conferir características bem distintas a diferentes espécies que resultam da acumulação de ácido láctico que se forma em resultado da glicólise post mortem. A quantidade de ácido láctico que se forma está relacionada com a quantidade de hidratos de carbono (em particular glicogénio) armazenados nos tecidos e conduz a um abaixamento do pH. Segue-se então a fase de instalação do rigor mortis que se caracteriza por uma contração do músculo em consequência da ligação irreversível das principais proteínas contrácteis - actina e miosina- devida à diminuição rápida da concentração do ATP e ao aumento dos níveis de iões cálcio no sarcoplasma (Huss, 1995). O rigor

mortis ocorre entre 1 a 7 horas após a morte e caracteriza-se pelo enrijecimento muscular devido à contração das fibras e ocorre de forma irreversível em decorrência do esgotamento das reservas energéticas (Ordóñez-Peneda, 2005). É de realçar que o tempo que decorre até à instalação e entre esta fase e a resolução do rigor mortis varia de espécie para espécie e é afetado pelo tipo de captura (maior ou menor stress), a condição física e biológica, tamanho, temperatura a que o pescado é mantido após captura e manuseamento (Huss, 1995). Após estas fases inicia-se a autólise e mais tarde a degradação é dominada pela atividade microbiana.

No caso do peixe de aquacultura o rigor mortis tem início mais cedo se o peixe tiver sido submetido a jejum ou ocorrer a depleção das reservas de glicogénio ou mais tarde se o abate for efetuado por percussão.

Estas alterações que ocorrem no pescado podem ser divididas em três grandes grupos: sensoriais, físicas e químicas e microbiológicas.

1.4.1 Alterações sensoriais

As alterações sensoriais incluem as que são passíveis de ser percecionadas pelos sentidos tais como alterações ao nível do aspeto, cheiro, textura e sabor (Huss, 1995). Na maioria das espécies, as primeiras alterações sensoriais do pescado ocorrem ao nível do aspeto e textura. As alterações no cheiro e sabor característicos das espécies, desenvolvem-se, normalmente, após os dois primeiros dias de armazenagem em gelo. Segundo Huss (1995), existe um padrão característico de deterioração do pescado conservado em gelo que pode ser dividido em quatro fases: Fase 1: o pescado está muito fresco, possui cheiro característico da espécie (a maresia no caso de muitas espécies selvagens) e sabor adocicado. A cor da carne é também característica da espécie. Fase 2: ocorrem perdas ao nível do sabor e cheiro característicos. O sabor é neutro, mas não desagradável e a textura mantém-se agradável. Fase 3: começam a aparecer os primeiros sinais de deterioração e formação de compostos com cheiros desagradáveis, dependentes da espécie e do tipo de metabolismo dos microrganismos (aeróbio ou anaeróbio). Desenvolve-se o característico “cheiro a peixe” e inicia-se a acumulação de compostos azotados voláteis e de alguns compostos sulfídricos. No início desta fase o sabor pode ser ligeiramente ácido, frutado, ou até mesmo amargo principalmente no caso dos peixes gordos. Com o avançar do tempo, adquire ligeiro sabor amoniacal e sulfuroso e pode começar a desenvolver-se um cheiro ligeiramente ácido e/ou adocicado. Nos peixes gordos pode detetar-se um cheiro e sabor a ranço. A textura torna-se mole e aquosa ou seca e dura. Fase 4: o peixe pode ser classificado como deteriorado e pútrido. A 1ª e 2ª fase coincidem com as rápidas alterações autolíticas que ocorrem no início do post mortem. Nas últimas fases ocorre uma atividade bacteriana bastante intensa e as alterações no músculo tornam-se muito notórias (Nunes e Batista, 2004).

1.4.2 Alterações físicas e químicas

1.4.2.1 pH

Após a morte, a glicólise anaeróbia leva a uma descida do pH do músculo, resultante da acumulação de ácido láctico. Em regra, o estado nutricional, a condição física e o stress a que o pescado é sujeito no momento anterior à morte influenciam a quantidade de glicogénio armazenado e, conseqüentemente, o pH final do músculo na fase post mortem. Quanto maior for o teor de glicogénio no tecido muscular do animal vivo, maior vai ser a quantidade de ácido láctico formado e mais baixo o pH. Em geral, peixes bem alimentados e com uma morte pouco agitada contêm mais glicogénio que os peixes exaustos (Huss, 1995). A redução de pH observada vai ter influência nas propriedades físicas do músculo. Assim, à medida que o pH desce, observa-se uma desnaturação parcial das proteínas e uma redução da sua capacidade de retenção de água (Huss, 1995). Após esta descida do pH, o valor vai aumentando gradualmente durante a armazenagem devido à formação, entre outros, de compostos azotados, resultantes das reações autolíticas e bacterianas.

1.4.2.2 Catabolismo nucleotídico

Enquanto os peixes se encontram vivos, o ATP está permanentemente a ser sintetizado a partir do glicogénio pelo metabolismo aeróbio, sendo usado em vários processos, nomeadamente a contração muscular. Os teores de ATP médios nos peixes encontram-se entre 7 e 10 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, todavia variam muito com a espécie. Depois da morte, o metabolismo aeróbio deixa de funcionar, no entanto a síntese anaeróbia do ATP continua até esgotamento do glicogénio e a sua degradação irreversível se iniciar acompanhada pela libertação de iões Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, iniciando-se assim a fase pre rigor (Sikorski et al., 1990, Huss, 1995). Quando a concentração de ATP desce abaixo de 1,0 $\mu\text{mol/g}$ o músculo entra na fase de rigor mortis (Sikorski et al., 1990, Huss, 1995) que se caracteriza pelo endurecimento muscular devido à contração dos sarcómeros resultante da formação irreversível da actomiosina. A resolução do rigor mortis é um processo complexo que consiste na recuperação do relaxamento muscular causado pelo relaxamento do músculo e é coincidente com alterações autolíticas, em especial com o catabolismo dos nucleótidos. A degradação dos nucleótidos segue um padrão bem definido durante o qual se observa numa primeira fase a desfosforilação desde o ATP até inosina monofosfato (IMP), passando pelo difosfato de inosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP). Na fase seguinte, ocorre a degradação do IMP em inosina (Ino) e em hipoxantina (Hx). Esta fase é mais lenta, ocorre durante a conservação e deve-se em muito à ação de enzimas bacterianas sobre o IMP. Numa fase mais avançada a Hx degrada-se, originando xantina e ácido úrico. A taxa de degradação dos nucleótidos e da acumulação da hipoxantina varia muito de espécie para espécie. A IMP reveste-se de importância na medida em que é responsável pelo sabor característico do pescado fresco enquanto que a Hx, por sua vez, confere um sabor amargo, sendo que elevadas quantidades deste composto podem fornecer ao pescado um sabor inaceitável. A evolução da degradação dos nucleótidos depende de uma série de fatores, como o método de captura, o início e a resolução do rigor mortis, o manuseamento e as condições de armazenagem.

1.4.2.3 Compostos azotados voláteis

Ao longo da armazenagem do pescado em fresco vão sendo produzidos compostos voláteis que lhe conferem cheiro menos agradável. Entre estes destacam-se o azoto de trimetilamina (A-TMA) e a amónia pois são os principais responsáveis pelo desenvolvimento do cheiro forte a peixe, característico do pescado deteriorado (Huss, 1995) bem como outras aminas voláteis na constituição do azoto básico volátil total (ABVT) (Howgate, 2009). Estes compostos azotados resultam das atividades autolíticas e bacterianas, sobretudo a TMA que resulta da redução bacteriana do óxido de trimetilamina (OTMA). Este composto é um importante constituinte de algumas espécies de peixe e moluscos em fresco, sobretudo os provenientes de águas marinhas, nos quais a sua concentração pode atingir 5% (Huss, 1995). Numa mesma espécie a quantidade de azoto do óxido de trimetilamina (AOTMA) presente varia de acordo com a zona de captura, tamanho e condição física (Cann, 1982). No decorrer da conservação em gelo, a redução do OTMA a TMA deve-se geralmente à ação bacteriana, associada às espécies *Shewanella putrefaciens* e *Photobacterium phosphoreum* (Huss et al., 1997). O conjunto dos compostos azotado voláteis designa-se como ABVT e o seu teor é muito usado como critério de deterioração sobretudo no caso de pescado refrigerado.

1.4.2.4 Aminas biogénicas

Estes compostos são sintetizados naturalmente nos organismos por descarboxilação de aminoácidos livres levada a cabo por enzimas endógenas ou de origem bacteriana (Nunes et al., 2008). As bactérias com atividade descarboxilante podem fazer parte da flora inicial do produto ou podem ser introduzidas, por contaminação, durante a conservação e/ou processamento. As bactérias envolvidas pertencem a vários grupos, nomeadamente *Enterobacteriaceae*, géneros *Clostridium* e *Lactobacillus* e *Photobacterium*, entre outros (Nunes et al., 2008).

Existem vários fatores que condicionam a produção de aminas, desde logo a disponibilidade de aminoácidos, a presença de microrganismos com atividade descarboxilante bem como a existência de fatores que favoreçam esta atividade. 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.

O consumo de alimentos contendo elevada concentração de aminas biogénicas, nomeadamente histamina e tiramina, pode ter efeitos adversos, do tipo vasoativo e psicoativo ou ambos (Ten Brink et al., 1990). As intoxicações mais frequentes estão relacionadas com a presença de histamina e com o consumo de produtos da pesca, designadamente sardinha, carapau, sarda, cavala e atum.

1.4.2.5 Proteínas e aminoácidos livres

As proteínas musculares e do tecido conjuntivo podem sofrer alterações importantes após a resolução do rigor mortis devido à ação de várias enzimas endógenas que ficam ativas e participam no processo de autólise. Destas enzimas, destacam-se: as catepsinas que utilizam como substrato proteínas e péptidos, causando o amolecimento do tecido muscular; as calpaínas que utilizam como substrato de proteínas miofibrilares, causando o amolecimento do tecido muscular; e as colagenases que atuam sobre o tecido

conjuntivo, cuja ação se manifesta pelo seu amolecimento e pelo aparecimento de fissuras no músculo. A taxa de degradação das proteínas musculares depende da espécie, condição e condições de manuseamento e conservação (Sikorski et al., 1990), constituindo um importante fator de alteração da qualidade do pescado congelado, podendo ter menor expressão durante a conservação em refrigerado, a temperaturas entre 1 e 5 °C (Nunes et al., 2008).

No que respeita aos aminoácidos livres, a sua importância varia com a espécie. Os números são díspares, mas sabe-se que no peixe fresco o seu teor é sempre muito baixo, podendo aumentar rapidamente após a morte e sobretudo com a decomposição quando a temperatura não é controlada, caso da histidina que se pode converter em histamina e da guanina, que desempenha um papel importante na pigmentação da pele dos peixes, conferindo-lhes os tons iridescentes tão apreciados no peixe fresco. Em refrigerado e em congelado esta alteração tem menor expressão (Nunes et al., 2008).

1.4.2.6 *Lípidos*

Durante a armazenagem do peixe fresco ocorrem alterações ao nível dos lípidos, normalmente mais expressivas nas espécies com maior teor. As duas reações que mais concorrem para a perda de qualidade são a oxidação e a hidrólise. A grande quantidade de ácidos gordos polinsaturados presente nos lípidos de pescado torna esta fração muito suscetível à autooxidação. Esta reação inicia-se pela ação do oxigénio tripleto que envolve a formação de radicais livres e caracteriza-se pelo facto dos produtos formados entrarem de imediato na etapa seguinte da reação, promovendo a sua progressão (Kolakowska, 2003; Jacobsen et al. 2008). Os processos que influenciam a lipoperoxidação são a luz, a temperatura elevada, a alteração do pH e o contacto com o oxigénio. Os peróxidos são compostos instáveis que se convertem muito rapidamente em produtos secundários de cadeias de carbono mais curtas: ácidos carboxílicos, alcanos, aldeídos, álcoois e cetonas que originam diversos cheiros desagradáveis e, nalguns casos, possível aparecimento de uma coloração amarelada. Este processo representa a principal fonte de alteração dos lípidos do pescado, sendo conseqüentemente responsável por alterações no valor nutricional, cheiro, sabor, cor e textura (Huss, 1995, 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 reações 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 do pescado em congelado.

A hidrólise dos lípidos ocorre por ação de enzimas endógenas, principalmente lipases digestivas (presentes no trato digestivo de pescado). A ação 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 afetam muito expressivamente as propriedades sensoriais, embora alguns autores refiram que estes podem conferir um ligeiro sabor desagradável (Huss, 1995).

1.4.2.7 Alterações microbiológicas

Numa fase mais avançada a degradação do pescado é essencialmente microbiana, no entanto nem todos os microrganismos têm a mesma importância. O número de bactérias viáveis, presentes nos peixes marinhos encontra-se, em média, entre 10^2 e 10^6 ufc/cm² (na pele e brânquias) e 10^3 a 10^7 ufc/g no trato digestivo (Gram e Dalgaard, 2002). A flora bacteriana de pescado de águas temperadas é dominada por bactérias gram negativas psicrotróficas pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella* e *Shewanella* e às famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae* (Huss, 1995; Gram e Huss, 1996), 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 ativo no processo. Apenas uma pequena fração destes microrganismos contribui para a deterioração, sendo designados por organismos específicos da degradação (SSO). Em condições particulares de temperatura, atmosfera, teor de sal, atividade da água, estes crescem mais rapidamente do que os restantes, produzindo metabolitos. Quando o pescado é capturado e colocado a bordo, o número de bactérias pode potencialmente aumentar devido à potencial contaminação, razão pela qual a higiene e um adequado manuseamento são fundamentais. Após classificação, separação e lavagem com água do mar, as bactérias são reduzidas de 1/3 para 1/10, em comparação com o momento antes da lavagem. Posteriormente, muitas outras fontes de contaminação podem alterar a carga microbiana original, aumentando o número de bactérias antes do pescado ser confeccionado. Tais fontes de contaminação incluem caixas de gelo, equipamentos e aparelhos que contactam com o pescado sem devida higienização, além de manuseamento sem assepsia e transporte inadequado (Jay, 2000).

A velocidade de degradação microbiológica é muito diferente de espécie para espécie não só devido ao habitat e zona geográfica, arte de captura, manuseamento, mas também às diferenças nas características intrínsecas da espécie. Assim, por exemplo o bacalhau (*Gadus morhua*) e a pescada (*Merluccius merluccius*), que têm uma pele de textura frágil, sofrem uma deterioração mais rápida em comparação com as solhas (*Solea* spp.) que possuem uma derme e epiderme muito robustas. Além disso os peixes planos possuem uma densa camada de muco superficial que contém diversos componentes antibacterianos que entre outras funções funcionam como enzimas bacteriolíticas (Gram e Dalgaard, 2002).

Durante a armazenagem em refrigerado, a microflora altera-se devido às diferentes capacidades que os microrganismos possuem para tolerarem o meio de conservação. As bactérias Gram negativas e fermentativas (como as *Vibrionaceae*) degradam pescado não conservado, enquanto que bactérias Gram-negativas psicrotolerantes (como a *Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp.) crescem em pescado refrigerado. Bactérias aeróbias Gram-negativas são normalmente inibidas em produtos da pesca conservados através da adição de sal, de uma ligeira acidificação e/ou embalados sob vácuo e refrigerados. Nestas condições, a microflora é dominada por bactérias lácticas (LAB) (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) em associação com bactérias fermentativas gram-negativas como *P. phosphoreum* e *Enterobacteriaceae* psicrotróficas (Gram e Dalgaard, 2002).

Algumas bactérias de deterioração, por exemplo a *Shewanella putrefaciens* e alguns membros da família *Vibrionaceae* produzem sulfureto de hidrogénio (SH₂) a partir de aminoácidos sulfurados (ex. cisteína)

enquanto que outros compostos sulfurados -mercaptano e o dimetilsulfito- são formados a partir da metionina. Estes compostos sulfídricos voláteis conferem cheiros característicos muito desagradáveis (Gram e Dalgaard, 2002).

A contaminação biológica pode ocorrer principalmente devido à presença de bactérias patogênicas, vírus, parasitas, biotoxinas marinhas e amins biogênicas.

As bactérias patogênicas que se encontram presentes no pescado podem ter origem aquática, do ambiente em geral e animal/humana. As do meio ambiente aquático estão presentes, normalmente, em baixas quantidades com exceção dos *vibrios* marinhos, e o risco de causarem doença é normalmente baixo a não ser que ocorra crescimento depois da captura (Huss et al., 2004). As bactérias do meio ambiente geral, como *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* podem contaminar facilmente o pescado, mesmo a temperaturas de refrigeração (Huss et al., 2004). Por seu lado, as bactérias de origem animal/humana como a *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *E. coli* estão associadas a contaminação fecal do pescado ou como consequência de más práticas na manipulação, como a ocorrência de contaminações cruzadas, falta de higiene dos operadores, etc. Contaminações por *Staphylococcus aureus* também podem ocorrer durante o processamento, constituindo um risco principalmente em produtos cozinhados, por exemplo camarões cozidos, nos quais a flora normal já foi inativada, permitindo assim o crescimento de estafilococos (Huss et al., 2004).

Os vírus, embora não se multipliquem na água ou no pescado, podem sobreviver durante muito tempo independentemente das condições de tempo, temperatura ou outras condições físicas. Os vírus implicados em doenças de origem alimentar relacionadas com o pescado têm origem no trato gastrointestinal do Homem, e a sua presença na água e no pescado deve-se a uma higiene pobre, ou seja, ou a água se encontra contaminada com resíduos de esgotos ou os produtos da pesca são contaminados pelos manipuladores com más práticas (Huss et al., 2004).

No pescado, tanto marinho como de água doce, podem encontrar-se frequentemente parasitas que podem afetá-lo quando vivo, causando-lhes doenças ou malformações, ou após captura, como no caso dos mixosporídeos que produzem amolecimento e liquefação do músculo pela grande quantidade de proteases que libertam. Os parasitas podem também afetar o consumidor quando este ingere pescado parasitado. Os nemátodes, céstodes e tremátodes são aqueles que se encontram mais presentes no pescado. Os principais problemas de saúde pública em humanos prendem-se com as infestações causadas por helmintas, sendo os nemátodes, fundamentalmente os da família *Anisakidae*, os que atualmente têm maior relevância. Em geral, a infestação em humanos deve-se à ingestão de pescado parasitado que se consome cru ou com tratamentos culinários suaves que não produzem a morte dos parasitas ou das suas larvas, causando uma zoonose parasitária no consumidor, que no caso do *Anisakis simplex* tem o nome de anisakiase. Outro problema destes parasitas é a alergia causada pela sensibilidade aos alérgenos das larvas, fundamentalmente associados aos produtos de secreção/excreção ou às suas proteínas somáticas (Huss et al., 2004).

As biotoxinas marinhas são compostos de natureza não-peptídica que em grande parte atuam através da modulação de canais iónicos nas células, e que resultam de microalgas do grupo dos dinoflagelados. Estas produzem toxinas que atingem diretamente o homem em resultado da ingestão sobretudo de moluscos bivalves. Existe um conjunto de diferentes síndromes de envenenamentos associados a algas

marinhas tóxicas, que incluem a intoxicação paralisante (PSP), a intoxicação amnésica (ASP), a intoxicação diarreica (DSP), a intoxicação neurotóxica (NSP) e a intoxicação por azaspirácido (AZP). Mas existem também síndromes de intoxicação associadas ao consumo de peixes ósseos, como a intoxicação ciguatérica relacionadas com o consumo de determinados peixes tropicais (CFP) e a intoxicação por espécies de peixes com tecidos naturalmente tóxicos como o peixe-balão (Huss et al., 2004).

As aminas biogénicas enquadram-se no grupo de substâncias biologicamente ativas que possuem a capacidade de exercer efeitos agudos no Homem, sobretudo ao nível dos sistemas vascular e nervoso. As aminas biogénicas são produzidas nos alimentos através da descarboxilação de aminoácidos catalisadas por descarboxilases bacterianas. De todas as aminas biogénicas destaca-se a histamina, uma amina biogénica heterocíclica formada no peixe, post mortem, através da descarboxilação do aminoácido histidina, que se torna tóxica para o Homem quando presente em concentrações elevadas (Huss et al., 2004).

1.4.2.8 Contaminação química

A contaminação química do pescado e produtos à base de pescado resulta principalmente da presença de metais pesados, poluentes orgânicos persistentes (POP), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e resíduos de medicamentos veterinários no caso do pescado de aquacultura. Mais recentemente tem sido dada muita importância aos contaminantes emergentes, entre os quais se destacam produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, retardadores de chama (BFR), compostos perfluorinados (PFC), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos PAH e plastificantes, não existindo ainda para todos regulamentação específica.

Os metais pesados são elementos químicos com massas atómicas que variam entre os 63,5 e os 207,2. Estes ocorrem naturalmente no ambiente, mas a grande quantidade deles pode ser atribuída às práticas humanas, como as emissões industriais. Todos têm bastante afinidade com proteínas celulares e ligam-se mais facilmente a estas do que a outros metais presentes no corpo e como consequência disso provocam a inibição de algumas reações enzimáticas. Como a taxa de eliminação é bem mais lenta do que a taxa de absorção, os metais pesados acabam por acumular-se nos organismos marinhos e no ser humano ao qual podem causar efeitos adversos. Os principais metais pesados encontrados no pescado são o Hg, cádmio (Cd) e chumbo (Pb). O Hg é introduzido no ambiente por fontes naturais ou antropogénicas, as primeiras devem-se principalmente a processos naturais de desgaseificação da crosta terrestre, depósitos minerais e vulcões e evaporação a partir da água e solos e as antropogénicas resultam de pesticidas e fungicidas, tintas, resíduos de indústrias e equipamentos elétricos e de atividades mineiras. O MeHg, é a forma mais relevante de exposição humana através da dieta alimentar e corresponde a cerca de 90% do mercúrio total. O MeHg insere-se na cadeia alimentar através de uma rápida difusão e ligação às proteínas e distribui-se pelos tecidos a partir do plâncton que é consumido por peixes não predadores, que mais tarde servem de alimento a peixes predadores. Assim, o MeHg acumula-se na cadeia alimentar aquática, acabando por originar elevadas concentrações nos peixes, que quando entram no circuito alimentar, podem trazer efeitos adversos à saúde. A bioconcentração do MeHg nos organismos aquáticos chega a ser 1000 vezes maior do que a concentração de mercúrio na

água. Os peixes eliminam o metilmercúrio muito lentamente e nos adultos essa eliminação tem uma meia vida média de 80,2 dias, mais especificamente, 81,6 dias no sexo masculino e 78,9 dias no sexo feminino (Jo et al., 2015). Os teores máximos permitidos de Hg no pescado encontram-se estabelecidos no regulamento (CE) N.º 1881/2006 (CE, 2006). O cádmio encontra-se na natureza ligado ao zinco e chega ao ambiente como consequência da atividade metalúrgica, encontrando-se disseminado no meio aquático e, no pescado, acumula-se essencialmente no fígado e no rim. Os moluscos, mais propriamente os cefalópodes, acumulam normalmente teores mais elevados, Regulamento (CE) N.º 1881/2006 (CE 2006). O chumbo encontra-se no ambiente devido a atividades industriais (metalurgia, compostos à base de chumbo, como aditivos de gasolina, etc.). A quantidade de chumbo encontrada no pescado é influenciada principalmente com a concentração deste metal na água. Os teores máximos permitidos de chumbo no pescado encontram-se indicados no regulamento (CE) N.º 1881/2006 (CE, 2006).

Os poluentes orgânicos persistentes (POP) podem contaminar o ambiente e ser absorvidos pelas cadeias alimentares, acabando por contaminar o pescado destinado ao consumo humano. Resultam, em regra, de descargas agudas (ex.: episódios acidentais de derrames de químicos para os cursos de água) ou crónicas de poluentes (ex.: lixiviação de químicos de solos contaminados ou tratados para a superfície da água) para o meio aquático. Destacam-se os bifenilos policlorados (PCB), as dioxinas e os furanos, como os compostos que mais preocupações têm gerado em torno do pescado. O Regulamento (CE) N.º 835/2011 (CE, 2011) determina os teores máximos destes compostos admitidos no pescado.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos formam-se pela combustão incompleta de alguns alimentos, pelo que representam um perigo principalmente nos produtos fumados. Alguns deles, como é o caso do benzopireno, possuem propriedades cancerígenas. Os teores máximos encontram-se definidos no Regulamento (CE) N.º 1881/2006 (CE, 2006)

Os resíduos de medicamentos veterinários no pescado de aquicultura derivam de fármacos usados em aquicultura para prevenir ou tratar doenças, controlar parasitas, ajudar processos reprodutivos, etc. O perigo para a saúde pública destes compostos surge quando são utilizados químicos não aprovados ou quando ocorre um abuso do uso dos permitidos. O Regulamento (CE) N.º 37/2010 (CE, 2010) define as substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.

Relativamente aos aditivos e corantes alimentares, o perigo para a saúde pública destes compostos surge quando são utilizados produtos não aprovados ou quando ocorre um abuso do uso dos permitidos, pelo que apenas os indicados no anexo II do regulamento (CE) N.º 1333/2008 (CE, 2008) podem ser colocados no mercado enquanto tais e utilizados nos géneros alimentícios nas condições de utilização especificadas.

1.5. Benefícios associados ao consumo de pescado

O pescado desempenha um papel importante na alimentação humana uma vez que representa, em diversas regiões do mundo, o alimento mais disponível e a principal fonte de proteínas de origem animal (FAO, 2020). Segundo a Sociedade Europeia de Cardiologia (Piepoli et al., 2016) é aconselhável consumir pelo menos duas refeições semanais de pescado de modo a promover o bom funcionamento do organismo e prevenir algumas patologias. Para este efeito concorre a grande disponibilidade de

espécies de peixe, crustáceos e moluscos e a diversidade de apresentações que proporcionam regimes alimentares não monótonos e a presença de gordura polinsaturada do tipo ómega 3 (Nunes et al., 2008, Nunes et al., 2011). O pescado é, assim, cada vez mais considerado indispensável na alimentação de consumidores de todas as idades.

De entre os vários constituintes do pescado, os ácidos gordos ómega-3 são os que mais contribuem para os benefícios associados ao seu consumo. O importante papel dos n-3 PUFA na prevenção e tratamento de algumas doenças só foi evidenciado após estudos epidemiológicos, desenvolvidos na década de 70, junto de uma população de esquimós da Gronelândia. Assim, verificou-se esta população que tinha uma alimentação muito rica em gordura de animais marinhos (foca, baleia e peixe) tinha uma baixa incidência de doenças cardiovasculares. Porém, o facto desta gordura apresentar um elevado teor de n-3 PUFA levou a associar estes constituintes a um limitado número de doenças associadas à trombose coronária. Estudos posteriores de hábitos alimentares dos esquimós a viver na Dinamarca mostraram que a composição dos lípidos do sangue era essencialmente idêntica à dos dinamarqueses e distinta da dos esquimós da Gronelândia. Esta avaliação permitiu concluir que as diferenças estariam relacionadas com a alimentação, desempenhando o consumo de pescado o papel principal (Innes e Calder, 2020).

Outros estudos epidemiológicos têm evidenciado que o consumo de pescado, devido ao elevado teor de n-3 PUFA, diminui o risco de doenças cardiovasculares, hipertensão, cancro, osteoporose, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (Nunes et al., 2011). Nos últimos anos têm sido realizados inúmeros estudos que permitiram conhecer o papel dos n-3 PUFA na prevenção da doença cardiovascular e na diminuição do teor de triglicéridos no sangue, produzindo o efeito único de baixar o nível de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) o que contribui para o seu efeito hipocolesterolémico. Os mecanismos subjacentes ao efeito cardioprotetor dos n-3 PUFA não são ainda totalmente compreendidos, podendo incluir a alteração da fluidez e da sinalização através das membranas, modulação do funcionamento dos canais iónicos da membrana, bem como a redução da hipertrigliceridémia, da tensão arterial, da vasoconstrição e da agregação plaquetária, incluindo efeitos anti-inflamatórios (Innes e Calder, 2020). Além disso, o consumo de n-3 PUFA, também parece ter efeitos benéficos na saúde ocular (Nunes et al., 2011), na prevenção ou tratamento de artrite e outros distúrbios inflamatórios e autoimunes, bem como de certos tipos de neoplasias (Borgilsson et al., 2010). O baixo consumo alimentar de n-3 PUFA tem sido implicado no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, abrangendo domínios específicos nomeadamente o desenvolvimento corporal, neuro-degeneração, cognição ou neuro inflamação (Innes e Calder, 2020).

Os eicosanóides, compostos, que incluem prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, agem como hormonas locais, atuando como mediadores e reguladores de processos inflamatórios, com ações que incluem a indução da febre, aumento da vasodilatação e permeabilidade vascular, ativação da perceção da dor e estimulação da coagulação sanguínea por alteração da capacidade de agregação das plaquetas (Innes e Calder, 2018). Devido à sua prevalência nos fosfolípidos das membranas das células envolvidas nos processos inflamatórios, o ácido araquidónico é geralmente o principal substrato para a síntese de eicosanóides (Innes e Calder, 2020). Estes compostos derivados do ácido araquidónico são biologicamente ativos em pequenas quantidades e, se forem formados em grandes quantidades, contribuem para a formação de trombos e ateromas, bem como de distúrbios alérgicos e inflamatórios, principalmente em pessoas suscetíveis (Innes e Calder, 2020). Por outro lado, os eicosanóides derivados

do EPA têm uma estrutura diferente dos produzidos a partir do ácido araquidônico, o que os torna em geral menos potentes (Innes e Calder, 2020). Deste modo, a presença de EPA e DHA nos fosfolípidios das membranas das células envolvidas nos processos de inflamação, pode levar a uma diminuição dos mediadores de inflamação derivados do ácido araquidônico, devido à diminuição da presença deste ácido (Innes e Calder, 2020). Por outro lado, a incorporação de EPA e DHA nas membranas celulares parece conduzir a outros efeitos anti-inflamatórios relacionados com a regulação da expressão genética pró-inflamatória e produção de mediadores lipídicos com potencial de resolução da inflamação (resolvinas, protectinas e maresinas) (Innes e Calder, 2020).

O Painel sobre Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) recomenda que a ingestão média diária de lípidos se situe entre os 20 e os 35% do total energético, podendo este valor chegar aos 40% no caso das crianças com idade inferior a 3 anos (EFSA, 2017). No entanto, uma vez que os efeitos para a saúde associados ao consumo dos diferentes tipos de ácidos gordos são distintos, o mesmo painel estabeleceu valores de referência diferentes para SFA, MUFA e PUFA. Assim, em relação aos SFA, dado que estes podem ser sintetizados pelo organismo e que existe uma relação positiva entre o aumento da sua ingestão e o aumento da concentração plasmática de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), havendo ainda evidências de que a sua substituição por n-6 PUFA (sem alterar a ingestão total de gordura) leva à diminuição da ocorrência de acidentes cardiovasculares, o painel decidiu estabelecer que a dose diária de SFA deveria ser tão baixa quanto possível (EFSA, 2010 e 2017). Quanto aos MUFA, o painel decidiu não definir nenhum Valor de Referência para a sua ingestão, pois também são sintetizados pelo organismo, não tendo, no entanto, um papel específico conhecido na prevenção ou promoção de doenças relacionadas com a dieta, (EFSA, 2010a e 2017a). Finalmente, em relação aos PUFA, o painel estabeleceu que o ácido linoleico deveria representar 4% do total energético, considerando que se trata de um ácido gordo essencial, necessário para manter a integridade metabólica, e ainda a existência de uma relação negativa entre a ingestão deste ácido e a concentração sanguínea de colesterol LDL, bem como a existência de uma relação positiva entre a ingestão deste ácido e a concentração sanguínea de colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade. Já em relação aos n-3PUFA, o painel estabeleceu um valor de 0,5% do total energético, como valor adequado para o ácido α -linolénico, por ser um ácido gordo essencial, necessário para manter a integridade metabólica. No entanto, considerando a baixa eficiência na biossíntese de EPA e de DHA e a já referida importância destes dois ácidos, o painel recomendou, a partir dos dois anos de idade, a ingestão diária de 250 mg de EPA e DHA como forma de prevenir a ocorrência de doenças cardiovasculares. Já no caso das grávidas e lactantes, a EFSA recomenda que esta ingestão seja reforçada com mais 100 a 200 mg/dia de DHA, para compensar a acumulação de DHA na gordura corporal do feto. No caso das crianças com menos de dois anos é recomendada uma ingestão diária de 100 mg de DHA (EFSA, 2010 e EFSA, 2017)

Logo, uma alimentação rica em peixe e óleos de peixe está associada a uma diminuição do nível de triacilgliceróis no sangue (efeito hipolipidémico) e das LDL, bem como a um aumento do teor das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e à redução das lipoproteínas de baixa densidade (Nunes et al., 2011). De notar que a presença de concentrações elevadas de LDL no plasma tem sido associada ao desenvolvimento de aterosclerose coronária e cerebral, enquanto pelo contrário, as HDL oferecem um efeito protetor contra esta doença (Innes e Calder, 2020).

Tal como já referido as proteínas do pescado apresentam elevada qualidade e digestibilidade e podem ter um importante papel na prevenção de algumas doenças como por exemplo a diabetes (Nunes et al., 2011) O pescado possui também vitaminas lipossolúveis, das quais se evidenciam as vitaminas A e D, imprescindíveis na saúde visual e dermatológica, e regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo (, Nunes et al., 2008). O pescado, na sua generalidade, apresenta níveis consideráveis de potássio, fósforo, iodo e selénio. O potássio é o principal catião do meio intracelular, intervindo no balanço e distribuição da água, na manutenção do equilíbrio ácido base, no estabelecimento do potencial de membrana que suporta a atividade elétrica das fibras nervosas e musculares, participando na secreção hormonal, na regulação da síntese de proteínas e glicogénio, no controlo da pressão sanguínea e em diversas reações enzimáticas (Innes e Calder, 2020). O fósforo é um componente de todas as células, sendo constituinte de moléculas como os ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP, sendo imprescindível ao funcionamento da membrana celular, estrutura dos ácidos nucleicos, metabolismo energético e ósseo Innes e Calder, 2020. Já o iodo é um oligoelemento com importância para o correto funcionamento da tiroide, sendo um constituinte das hormonas T3 e T4, sintetizadas pela tiroide, que regulam o metabolismo, a expressão de genes e o crescimento e diferenciação de tecidos, nomeadamente do cérebro (Nunes et al., 2008). O selénio é constituinte de diversas selenoproteínas que participam nas defesas antioxidante e imunitária, no metabolismo das hormonas da tiroide e metabolismo dos músculos esquelético e cardíaco, tendo uma importante ação antioxidante no organismo do ser humano (Innes e Calder, 2020). Os níveis de colesterol na grande maioria dos peixes e crustáceos oscila entre 20 e 90 mg/100g, nos cefalópodes é normalmente mais elevada, podendo atingir cerca de 160 mg/100g, contudo a presença de quantidades apreciáveis de taurina nestas espécies contribui para reduzir a absorção do colesterol (Nunes et al., 2011).

Deste modo, é aconselhável o consumo regular de pescado devido à diversidade de espécies, quer em tamanho e forma, composição e variedade de confeções culinárias, pois o seu consumo contribui para regimes alimentares muito equilibrados, não monótonos e saudáveis. As escolhas devem sempre privilegiar espécies sustentáveis, isto é que possam ser geridas no presente tendo em atenção a continuação da sua exploração no futuro. Importa, todavia, ter em conta que a necessidade de se obterem maiores quantidades de pescado, o elevado crescimento populacional, o grande desenvolvimento tecnológico das últimas décadas e a implantação de indústrias poluentes junto às zonas costeiras e águas interiores, tem provocado profundas alterações nos ecossistemas aquáticos, contribuindo para a contaminação de espécies, que pode resultar num problema de saúde pública. Tal facto tem levado a uma preocupação crescente por parte da maioria dos países quanto à presença de diversos contaminantes nos produtos à base de pescado (contaminantes regulamentados e emergentes). No entanto, a EFSA (2015) considera que os benefícios são superiores aos riscos, usando o MeHg como referência.

1.6 Conservação e valorização do pescado

O pescado e produtos derivados são mais perecíveis do que a maior parte das outras matérias primas alimentares. Este facto deve-se ao colapso da estrutura celular, à elevada atividade da água, ao pH neutro ou pouco ácido, ao efeito combinado de reações químicas e enzimáticas e ao crescimento microbiano, fatores que desvalorizam rapidamente a qualidade e a aceitação. Para colmatar esta

dificuldade são aplicadas várias técnicas de conservação e processamento com as quais se pretende prolongar o tempo de vida útil, mantendo tanto quanto possível as características intrínsecas e nutricionais. Atualmente as técnicas de processamento e conservação do pescado incluem as mais tradicionais, como salga, seca e fumagem, as mais modernas como esterilização, pasteurização, refrigeração e congelamento e ainda as consideradas emergentes, entre as quais se destacam as embalagens modificadas, ativas e inteligentes, as altas pressões e os revestimentos edíveis.

1.6.1 Conservação do pescado em refrigerado e congelado

Desde os anos 60 do século passado que o frio industrial passou a ser indispensável na pesca, aquacultura e na indústria de processamento do pescado, desempenhando um importante papel a manutenção da qualidade e na extensão do tempo de vida útil.

O frio permite evitar ou diminuir as perdas frequentes de pescado durante a rede de comercialização e satisfazer a sua procura por parte dos consumidores e mercados longe dos locais de produção e captura. Com a conservação do pescado pelo frio pretende-se dificultar a ação microbiana e enzimática (sem ocorrer destruição das mesmas), alcançando-se esse objetivo sobretudo através da refrigeração e congelamento. A aplicação correta de frio exige que se use pescado fresco, de preferência após captura ou abate, e que o frio seja contínuo e permanente. A temperatura deve ser adequada, pois cada produto tem a sua temperatura ótima e o cumprimento de boas práticas é fundamental. A cadeia de frio tem que funcionar de forma segura de maneira a conservar os produtos de acordo com as suas características iniciais, sendo de extrema importância que esta não seja quebrada e que não existam diferenças significativas de temperatura entre o transporte, armazenamento, comercialização e conservação pelo consumidor.

1.6.1.1 *Refrigeração*

A refrigeração continua a ser o método mais utilizado para a conservação de pescado, servindo de base e auxiliar de outros. Este processo consiste em baixar e manter a temperatura do pescado tão perto dos 0 °C quanto possível (-1 e 8 °C, no entanto esta definição varia entre autores). É importante verificar a temperatura mais adequada para cada espécie/produto em causa, embora em termos comerciais seja muitas vezes conduzida a cerca de 4 °C por se considerar que a esta temperatura, a degradação do pescado é retardada, já que a ação das enzimas e o desenvolvimento microbiano são mais lentos e o desenvolvimento de microrganismos patogénicos é reduzido (WHO/FAO, 2012). Basicamente utiliza-se gelo, água do mar refrigerada ou arrefecida e ar refrigerado devendo os sistemas ser selecionados e concebidos de modo a fornecer a refrigeração adequada durante o armazenamento e nos momentos de picos de carga (tendo em atenção a densidade de maior eficiência a aplicar no sistema). Na maioria dos casos o uso de gelo em escama e a refrigeração mecânica ou a combinação de ambos são os sistemas mais usados. Em situações pontuais, como por exemplo nos crustáceos, também tem sido utilizado gelo líquido. Em alguns países do norte da Europa é muito frequente utilizar água do mar arrefecida com gelo ou água do mar refrigerada a bordo.

Também, de modo a minimizar a deterioração, é importante que a refrigeração seja homogênea e aplicada o mais cedo possível na cadeia, tendo sempre em atenção o manuseamento cuidadoso do pescado ao longo de toda a cadeia de distribuição. É preciso ter em atenção que a aplicação da refrigeração apenas oferece uma conservação temporária pois não evita o desenvolvimento microbiano (as bactérias psicrófilas desenvolvem-se quase a um ritmo normal a estas temperaturas) (WHO/FAO, 2012).

A conservação do pescado em fresco inicia-se nos barcos de pesca ou nas aquaculturas após o abate por hipotermia (na maioria dos casos) e vai até aos estabelecimentos de venda ao público. Nos barcos, o pescado deve ser mantido a uma temperatura próxima da do gelo fundente, sendo a cobertura do pescado com gelo uma técnica usada para baixar e manter a temperatura em 1°C até à sua chegada ao cais. Quando a conservação é feita em água do mar limpa refrigerada, os barcos devem estar equipados com porões com sistemas de arrefecimento. Estes devem ter a capacidade de reduzir a temperatura da mistura (água, pescado), para 3 °C no máximo em 6 horas após o enchimento, e para 0°C no máximo de 16 horas, com controlo e registo da temperatura (WHO/FAO, 2012). Nas lotas devem ser usadas medidas para evitar o aumento da temperatura do pescado. Por exemplo, a lavagem com água a temperaturas de 3°C, e o uso de gelo em escama durante a venda deve ser praticado. Depois da venda, o pescado deve ser acondicionado com gelo e transportado ou armazenado em câmaras com temperaturas a 2 °C e humidade relativa média de 90%. Estas condições permitem manter uma ligeira fusão do gelo, evitando a sua desidratação, e garantir a temperatura do produto entre 0 e 1°C. O pescado magro com as condições anteriores conserva-se em bom estado durante cerca de oito dias e o gordo até cinco dias. Nos estabelecimentos de venda a retalho o pescado deve ser colocado em câmaras, vitrinas, ou balcões com temperaturas o mais próximo dos 0°C, mas sempre com gelo ((WHO/FAO, 2012).

Existe um elevado número de estudos sobre conservação de diferentes espécies de pescado em fresco, destacando-se por exemplo os de Medina et al., (2009) e Sampels (2015).

1.6.1.2 Congelação

A congelação tornou-se um dos mais importantes processos na conservação do pescado. Este método é uma operação unitária que consiste em baixar a temperatura do pescado até que, a maior parte da água que o constitui, cristalize. A imobilização da água pelo gelo tem como resultado a concentração de solutos dissolvidos na água não congelada e a diminuição da sua atividade (Delgado et al., 2010). Desta forma, a água, embora esteja presente, encontra-se menos disponível para reações químicas e biológicas, e os microrganismos não podem desenvolver-se. É um dos métodos que mais prologa o tempo de conservação do pescado e dos produtos derivados (pode chegar até 2 anos), e é simultaneamente um método que bem conserva as propriedades originais destes produtos.

A congelação envolve três etapas: a primeira consiste no arrefecimento do produto até ao ponto de congelação, em que há libertação de calor sensível; a segunda consiste na eliminação do calor latente de fusão, e a terceira consiste na eliminação do calor sensível desde o ponto de congelação até à temperatura de conservação (Dempsey et al., 2012). Este processo, em que estão envolvidos fatores de natureza termodinâmica e cinética, compreende duas fases sucessivas: a nucleação e a cristalização

(Kiani e Sun, 2011). O tamanho dos cristais varia inversamente com o número de núcleos formados, assim para congelações mais rápidas a velocidade de nucleação é mais elevada do que a velocidade de crescimento do cristal e, como consequência, forma-se um elevado número de núcleos que originam pequenos cristais, ao contrário, quando a velocidade de congelação é lenta, o número de núcleos é menor e os cristais são maiores (Zaritzky, 2011). Assim, quanto mais rápida for a cristalização, melhor é a qualidade do produto final, pois os cristais de gelo formados serão pequenos, em grande número e igualmente distribuídos (intra e extracelular) e haverá uma menor deslocação da água. Pelo contrário, quanto mais lenta for a cristalização, maiores serão os cristais de gelo e maior será o dano causado nas membranas celulares o que afeta a textura do pescado (Nakazawa e Okazaki, 2020).

Durante a congelação, a água quando se transforma em gelo expande-se cerca de 9% enquanto os restantes constituintes se expandem em menor grau pelo que aquando da descongelação a variação de volume não é uniforme, resultando em danos físicos (Zaritzky, 2011). O aumento da concentração de solutos na matriz não congelada conduz ao aumento da força iónica o qual induz alterações nas estruturas das biomoléculas. As interações água-soluto alteram-se e as interações entre as macromoléculas, tais como as proteínas, aumentam. Os cristais de gelo ao romperem as estruturas celulares, como por exemplo os lisossomas e as mitocôndrias, libertam as enzimas contidas nestes organelos, levando à deterioração da qualidade do pescado. A maioria das enzimas estão ativas e existe uma grande probabilidade de entrar em contacto com os vários substratos (Zaritzky, 2012).

A congelação lenta produz cristais de gelo com maiores dimensões que, ao crescerem através da membrana celular, permitem a penetração de oxigénio, causando rancificação, alterações na cor e elevadas quantidades de exsudado durante a descongelação (Nakazawa e Okazaki, 2020).

A maior parte do pescado é congelado com recurso a sistemas mecânicos por contacto ou ar forçado, mas a congelação por criogenia tornou-se uma alternativa que a pouco e pouco vai substituindo a congelação mecânica. Este método consiste em submergir ou pulverizar o pescado com dióxido de carbono líquido ou azoto líquido. O produto é congelado quase instantaneamente e o refrigerante liberta-se para a atmosfera, pois evapora rapidamente em contacto com a temperatura ambiente. A congelação por salmoura só muito pontualmente é usada atualmente. Os produtos congelados são posteriormente vidrados, embalados, armazenados, distribuídos e comercializados em congelado, tendo um tempo de vida útil bastante longo. É, no entanto, importante considerar que durante a armazenagem em congelado ocorre uma perda de qualidade que, para além das características da matéria prima, é muito influenciada pelo tipo de congelação, embalagem e condições em que a armazenagem em congelado é efetuada.

Num pescado de boa qualidade, congelado de forma rápida e armazenado por um curto espaço de tempo, as alterações sensoriais nas fases de descongelação e confeção culinária são pequenas (Nakazawa e Okazaki, 2020). Contudo, com o passar do tempo, registam-se alterações sobretudo na textura, cor e sabor. Esta perda de qualidade do pescado congelado é devida fundamentalmente à desidratação, desnaturação proteica, alteração dos lípidos (oxidação e hidrólise) e alterações sensoriais. A desidratação advém sobretudo da formação e agregação de cristais de gelo que resultam de procedimentos inadequados e/ou flutuações de temperatura durante a armazenagem. Para a desnaturação proteica concorrem a desidratação e a presença de compostos resultantes da oxidação e hidrólise lipídica, embora nas espécies em que a enzima OTMAase é relevante haja a formação de

formaldeído (em quantidades equimoleculares com a dimetilamina) que tem a capacidade de formar ligações com vários grupos funcionais das proteínas e contribuir para a sua degradação

No que respeita às alterações da textura considera-se que elas, para além da desidratação, desnaturação proteica e alteração dos lípidos (oxidação e hidrólise) se devem também a transformações ao nível das miofibrilas, mais precisamente na sua capacidade de retenção da água que podem ter por base o afastamento ou a compressão entre elas, devido ao gelo que se forma entre as miofibrilas ou incapacidade, no momento da descongelação ou confeção culinária, de voltar a absorver a água que libertaram no processo de congelação, o que as impede de recuperar volume.

O desenvolvimento do sabor a ranço derivado da oxidação de ácidos gordos insaturados é um problema que afeta muitas espécies e produtos à base de pescado, sendo uma limitação ao seu tempo de vida útil. O pescado contém um elevado número de ácidos gordos insaturados e um teor excepcional de ácidos gordos ómega-3 como o EPA e DHA, razão pela qual é tão suscetível à oxidação lipídica. Alguns dos fatores que mais influenciam a taxa e extensão da oxidação lipídica do pescado resultam da concentração de ar (oxigénio) nas câmaras, da área da superfície exposta, do tipo de embalagem, do perfil de ácidos gordos que compõem a fração lipídica, da concentração de antioxidantes naturais ou adicionados bem como da temperatura média e eventuais flutuações de temperatura durante a armazenagem. Contudo, mesmo em peixes com baixo teor em lípidos observam-se alterações ao nível do sabor a ranço, os chamados sabores a cartão ou frigorífico. Estes têm sido atribuídos à formação de produtos da oxidação dos fosfolípidos presentes nas membranas celulares (Nakazawa e Okazaki, 2020).

Todos estes efeitos refletem-se na perda de capacidade de retenção da água, suculência e sabor e o desenvolvimento de cores baças e/ou amareladas (Nakazawa e Okazaki, 2020).

1.6.2 Outras formas de conservação

Os consumidores têm cada vez menos tempo para dedicar à preparação da sua alimentação, preferindo consumir alimentos que sejam minimamente processados, saudáveis e, simultaneamente, de preparação fácil e rápida. Esta nova tendência de consumo exigiu uma resposta adequada dos industriais e retalhistas que têm proporcionado alimentos frescos minimamente processados já embalados para maior comodidade de escolha e transporte do consumidor. Entre as estratégias recentes destacam-se, a embalagem em atmosfera modificada, o uso de filmes e revestimentos edíveis e as tecnologias não térmicas.

1.6.2.1 *Embalagem em atmosfera modificada (EAM) e ativa (EA)*

Têm sido realizados vários estudos sobre a aplicação da EAM ao pescado, sendo referido em muitos deles um aumento da vida útil de 50% para 100% nos peixes crus e de 100% a 200% no caso do marisco cozido (Sivertsvik et al., 2002). No entanto, muitos dos estudos sensoriais realizados revelam que apenas se consegue prolongar o período de qualidade moderada do pescado e não a sua qualidade superior (Sivertsvik et al., 2003). Todavia, fatores como a espécie, teor em gordura, carga microbiana, mistura de gases da atmosfera, temperatura utilizada no armazenamento bem como a aplicação das boas práticas de higiene e segurança durante toda a cadeia são cruciais. O princípio da aplicação da

EAM é a substituição do ar existente no interior da embalagem (78% de azoto (N_2), 21% de oxigénio (O_2), 0,03% de dióxido de carbono (CO_2) por uma mistura de gases de concentração fixa. Uma vez introduzida a nova atmosfera, não é realizado mais nenhum controlo sobre a sua composição, sendo natural que esta varie ao longo do tempo de armazenamento. Os principais gases utilizados em EAM são o CO_2 , o oxigénio (O_2) e o N_2). O CO_2 pode ser considerado como o principal elemento devido ao seu efeito bacteriostático e fungistático. O N_2 é um gás inerte, inodoro e pouco solúvel quer em água quer em gordura, é utilizado para prevenir o colapso da embalagem devido à dissolução do CO_2 e substituir o O_2 em embalagens de produtos sensíveis à oxidação. A utilização de O_2 é reduzida para inibir o crescimento de bactérias aeróbias, e também porque a sua presença pode potenciar reações de oxidação e o aparecimento de ranço. No entanto, nos peixes magros é utilizado para diminuir a perda de água e evitar alterações da cor e em algumas situações é também crucial a sua presença para evitar o crescimento de patogénicos anaeróbios. Os materiais de embalagem mais utilizados podem ser simples, extrudidos ou laminados de copolímeros de etileno-álcool vinílico, poliéster e polietileno, cloreto de polivinilo, polipropileno, poliéster-polietileno de tereftalato. A transparência é também um fator considerado na escolha, pois alguns produtos podem ser mais sensíveis à luz, podendo optar-se por materiais metalizados ou com filtros UV. A utilização deste processo pressupõe sempre uma conservação a temperaturas de refrigeração.

As embalagens ativas surgem com o objetivo de manter a qualidade e garantir a segurança dos alimentos através da sua interação intencional com o produto. As embalagens ativas têm várias funções adicionais em relação às embalagens passivas, pois alteram as condições do produto e aumentam a sua vida útil ao incorporarem ou imobilizarem substâncias no seu interior em vez da incorporação direta no produto (Kerry et al., 2006; Soares et al., 2009). Existem assim, embalagens ativas, com função de absorvente (por exemplo oxigénio, etileno, humidade e cheiro) e outras designadas emissores (dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas).

1.6.2.2 Filmes e revestimentos edíveis

Os filmes e revestimentos edíveis têm sido aplicados em alimentos em alternativa aos métodos de conservação tradicionais, embalagem sob vácuo ou em atmosfera modificada. Estes são aplicados à superfície dos alimentos, atuando como uma barreira mecânica, podendo assim controlar as trocas gasosas, diminuir as perdas nutritivas e de humidade e prevenir o crescimento de microrganismos que levam à deterioração do alimento (Embuscado e Huber, 2009; Pinheiro et al, 2010). O termo revestimento refere-se a uma suspensão ou emulsão aplicada por imersão ou aspersão na superfície do alimento que após a secagem forma uma camada protetora (Embuscado e Huber, 2009; Pinheiro et al, 2010;). A aplicação de revestimentos edíveis ao pescado é vasta, destacando-se os trabalhos de Duan et al. (2010) e Lu et al, 2010 em peixes e os de Yuan et al. (2016) e Wu (2014) em marisco. Os principais compostos utilizados no desenvolvimento de revestimentos comestíveis são normalmente agrupados em polissacarídeos (e.g. quitosano, alginato, amido, celulose carragenina, galactomananos), proteínas (gelatina, colagénio, proteínas do leite, glúten de trigo) e lípidos (ceras e glicéris). Segundo Embuscado e Huber (2009), o revestimento comestível ideal para aumentar o tempo de prateleira do pescado, deve ter, entre outras, as seguintes características: (i) fornecer estabilidade estrutural e evitar danos mecânicos durante a manipulação e transporte do alimento, (ii) ter uma boa aderência à superfície dos alimentos,

fornecendo uma cobertura uniforme; (iii) evitar a perda ou absorção de componentes que destabilizem o aroma, o sabor, a composição nutricional e características organolépticas necessárias para a aceitação do consumidor e (iv) ter a capacidade de incorporar aditivos, antioxidantes e agentes antimicrobianos.

Um dos revestimentos mais usados é o quitosano, um heteropolímero composto por ligação β (1 \rightarrow 4) de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, obtido através da desacetilação parcial da quitina, numa faixa de 80 a 85% ou mesmo superior. A quitina é produzida em grande parte a partir do processamento de crustáceos. O quitosano apresenta muitas vantagens em relação a outros compostos polissacarídeos, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade e muitos estudos têm vindo a demonstrar a sua capacidade antibacteriana e antifúngica (Vargas et al., 2009).

A formação de filmes e revestimentos edíveis com base em polissacarídeos exige na maioria dos casos, a presença de um plasticizante para melhorar a estrutura e reduzir a dureza, facilitando a aderência ao produto alimentar tais como: ésteres, água, oligossacarídeos, glicóis, fenóis, cetonas e éteres (Santos, et al., 1999, Suyatma et al., 2005). A aplicação é feita diretamente sobre a superfície do produto alimentar por imersão, pulverização com o objetivo de criar uma atmosfera modificada no próprio alimento. Após a aplicação do revestimento no produto, em geral, realiza-se uma pequena secagem para que se dê uma adesão mais eficaz do revestimento (Falguera et al., 2011; Ramos et al., 2012).

1.6.2.3 Tecnologias não térmicas

Nos últimos anos as tecnologias não térmicas, como aquecimento ómico, microondas e radiofrequência bem como as altas pressões e pulsos elétricos têm ganho aceitação pelo facto de gerarem energia térmica nos alimentos de forma mais eficiente que os métodos convencionais (Gou et al., 2010, Knoerzer, et al., 2015). Por outro lado, estas tecnologias permitem considerar não só os aspetos da segurança alimentar, mas também os relacionados com o ambiente e a economia do processo (Gou et al., 2010). O uso de novas tecnologias utilizando agentes físicos e substâncias conservantes apresentam potencial para inativar ou proteger produtos alimentares, tais como produtos da pesca e aquicultura, de microrganismos degradativos e patogénicos, manter as características químicas e sensoriais e até prolongar o tempo de vida útil dos produtos (Devlieghere et al., 2004, Knoerzer, et al., 2015).

A alta pressão tem várias vantagens em relação ao processamento térmico convencional, pois verifica-se uma redução do tempo de processamento e as alterações físicas e químicas no produto são minimizadas, conservando-se o sabor, a textura e a cor, sem causar alterações significantes na qualidade nutricional do alimento. Atualmente esta tecnologia está a ser utilizada a nível industrial com sucesso numa seleção variada de produtos tais como, refeições prontas a consumir, molhos, produtos fumados e pescado cru e processado, entre outros (Ramasmamy et al., 2004). As altas pressões (tempo, temperatura e gamas de pressão) têm sido testadas, para diversos fins e em diversas espécies de pescado, destacando-se a sua eficácia para reduzir ou inativar o crescimento microbiano de acordo com os resultados positivos relatados em camarão tigre (Kaur et al., 2012), salmão fumado (Erkan et al., 2011a), salmonete (Erkan et al., 2011b), lulas e potas (Gou, Lee, & Ahn, 2009) e em bacalhau (Montiel, et al., 2012). Importa, todavia, ter em conta que a aplicação desta tecnologia exige uma otimização prévia para evitar alterações indesejáveis na textura e no aspeto (Montiel, et al., 2012).

Por seu lado, os pulsos elétricos têm a vantagem de os tempos de tratamento serem relativamente curtos, todavia, são sobretudo eficientes em produtos líquidos ou pastosos, podendo complementar um tratamento térmico, ou substituí-lo completamente. As polpas de peixe, dada a sua estrutura e viscosidade, constituem um dos produtos potenciais para a aplicação deste método, sendo sugerido neste caso a aplicação de uma corrente elétrica forte (15–40 kV cm⁻¹) (Toepfl et al., 2006). Esta tecnologia proporciona a pasteurização a baixas temperaturas de produtos da pesca, mantendo as características sensoriais do produto, mas têm particular interesse para descongelação rápida e descontaminação de alimentos sensíveis ao calor (Oms-Oliu e Martin-Belloso, 2010). Os pulsos elétricos têm sido testados, para diversos fins e em diversas espécies de pescado, destacando-se a sua eficácia para reduzir ou inativar o crescimento microbiano de acordo com os trabalhos publicados em salmão por Ozer e Demirci (2005).

Estas tecnologias têm claros benefícios do ponto de vista ambiental, como por exemplo menores gastos de água e de energia (Toepfl et al., 2006, Pereira e Vicente, 2009). Todavia, a sua implementação a nível industrial é ainda reduzida, sobretudo devido aos ainda elevados custos do equipamento (Pereira e Vicente, 2009).

1.7 Novas formas de apresentação

Alguns consumidores ainda continuam a ser muito conservadores, privilegiando nas suas opções de aquisição o pescado fresco proveniente da pesca ou da aquacultura, sob a forma de peixe inteiro por vezes descabeçado, escamado e eviscerado na altura da compra. No que respeita aos congelados as principais opções passam por postas, filetes ou outro tipo de porção. Os produtos salgados continuam a merecer preferência por parte dos consumidores, sobretudo o bacalhau salgado seco em determinadas épocas do ano, como no Natal. As conservas, principalmente as de atum, têm também uma procura significativa, embora a de outras espécies tenha vindo a aumentar (INE, 2020).

Todavia, verifica-se que o estilo de vida da sociedade dos dias de hoje é muito diferente do que era há 20 ou mesmo 10 anos, havendo uma procura crescente por produtos minimamente processados ou prontos a confeccionar ou a consumir. Assim, muitos consumidores optam por produtos à base de pescado já preparados, prontos a cozinhar ou até prontos a consumir que preservem o seu valor nutricional e, essencialmente, a cor natural, uma textura e sabor de elevada qualidade e que sejam semelhantes ao produto fresco, tendo preferência pela reduzida adição de aditivos ou pela sua substituição por ingredientes naturais com propriedades semelhantes. Por outro lado, há uma pressão crescente para que os recursos da pesca e da aquacultura sejam utilizados de forma responsável e sustentável, evitando a geração de subprodutos e indo de encontro à atual procura dos mercados e consumidores.

Deste modo, existe algum potencial para inovar ao nível das apresentações de produtos da pesca e aquacultura frescos, nomeadamente filetes e postas de salmão, perca, peixe-espada e espadarte, filetes já temperados e apropriados para confeção culinária em micro-ondas, a vapor ou grelhador elétrico, hambúrgueres, almondegas, salsichas, molhos e sopas de peixe. A oferta de produtos cozidos comercializados em fresco, como camarões, caranguejos, búzios e sapateiras, tem também aumentado, sendo expectável, segundo informação de alguns hipermercados (comunicação pessoal) uma procura crescente, sobretudo em ocasiões festivas e fins de semana (Figura 1.12). O recurso a novos tipos de

embalagem, por exemplo sob vácuo ou atmosfera modificada, também tem contribuído para facilitar a inovação ao nível das apresentações de pescado.



Figura 1.12. Novas apresentações, produtos prontos a cozinhar e produtos prontos a consumir.

Outras novas apresentações têm surgido ao nível dos congelados, por exemplo lulas e potas limpas, recheadas, ou sob a forma de espetadas e tiras, polvo limpo cozido e congelado, refeições de polvo à lagareiro e mariscadas. No que respeita às conservas, destaca-se a adição de novos ingredientes (por exemplo algas) e de novos molhos (por exemplo à base de caril). Um outro aspeto que é igualmente relevante é a oferta crescente de embalagens unifamiliares.

O desenvolvimento de novas receitas à base de pescado tem também merecido a atenção de vários chefes cujos desenvolvimentos tem dado origem a várias publicações no Facebook, Instagram e Twitter a livros como “Foolproof Fish: Modern Recipes for Everyone, Everywhere” (Wolter, G., 2020).

2. OBJETIVOS

O consumo de pescado tem aumentado nos últimos anos pelo facto de os consumidores estarem mais informados sobre a sua contribuição para a saúde e bem-estar. Assim, a diversidade de espécies e os importantes nutrientes que proporciona tornam-no indispensável na dieta alimentar de todos os segmentos da população. As proteínas apresentam elevado valor biológico e os lípidos proporcionam ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa do tipo ómega-3 que, para além da importância nutricional, são bem reconhecidos pelos benefícios na prevenção de muitas doenças. Por seu lado, alguns minerais, como o iodo e o selénio, e as vitaminas A, D e do complexo B têm um papel fundamental como reguladores da expressão de diversos genes e como cofatores de enzimas metabólicas essenciais.

Todavia, os hábitos dos consumidores a nível mundial mudaram e tem levado a que muitos privilegiem a aquisição de produtos prontos a cozinhar ou prontos a consumir e a restauração e alguns industriais solicitem matérias primas mais convenientes (sobretudo postas e filetes) com tempos de vida útil mais prolongados quer em refrigerado quer em congelado.

Assim, considerando que:

(i) Portugal apresenta um padrão de consumo de pescado único na Europa, pois as estimativas apontam para valores *per capita* ao redor de 57 kg por ano, e que o setor da pesca, integrando a captura, transformação e comercialização do pescado, constitui uma atividade fundamental cuja relevância transcende os aspetos puramente económicos, uma vez que o seu contributo social e como fonte de subsistência apresentam inegável importância e significado; (ii) o consumo de cefalópodes, principalmente, polvo, representa uma parcela estimável do consumo *per capita* (entre 2-3 kg por ano, sendo expectável um aumento de consumo, conseguido não só à custa da produção nacional mas também de uma forte contribuição da importação); (iii) os hábitos alimentares dos portugueses se alteraram muito nos últimos anos, com uma mudança para alimentos minimamente processados, convenientes, práticos e rápidos de cozinhar ou prontos a consumir, (iv) a procura dos setores da restauração, distribuição e retalho está a orientar as suas preferências para matérias primas mais convenientes e mais estáveis e (v) os consumidores e mercados exigem cada vez mais informação suportada por informação analítica credível foram objetivos deste trabalho:

- ✓ Avaliar o efeito da cozedura em condições industriais na retenção/eliminação dos principais nutrientes do polvo comum (*Octopus vulgaris*), capturado na costa portuguesa e caracterização do valor nutricional do produto obtido;
- ✓ Estudar possíveis alterações do polvo comum, cozido e ultracongelado em ambiente industrial, bem como do caldo de cozedura, durante a armazenagem em congelado (- 20 °C), caracterizando as principais alterações físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais que ocorrem durante a armazenagem;
- ✓ Eleger dois revestimentos de entre os mais utilizados em produtos da pesca e aquacultura, otimizar as condições de aplicação e selecionar o mais adequado à conservação em refrigerado e congelado;

- ✓ Estudar o efeito do revestimento selecionado na conservação de filetes de robalo (*Dicentrarchus labrax*) de aquacultura, embalados e armazenados em refrigerado e em congelado em condições usuais, na qualidade e tempo de vida útil, analisando a evolução dos principais parâmetros químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria prima

3.1.1 Polvo comum (*Octopus vulgaris*)

Os polvos da costa portuguesa usados (vinte e três exemplares), foram capturados na zona de pesca Cascais-Península de Setúbal e adquiridos no dia do desembarque na lota da Costa da Caparica, no Inverno (Figura 3.1). De seguida, foram transportados para o IPMA (cerca de 30 minutos) em caixas de plástico adequadas e mantidos durante a noite numa câmara de refrigeração (4 °C). Na manhã seguinte todos os polvos foram identificados, pesados, eviscerados, lavados, escorridos, acondicionados individualmente em sacos de polietileno (para congelação de alimentos, Vileda) (Figura 3.2) e imediatamente congelados a -20 °C.



Figura 3.1. Aspeto do polvo desembarcado em lota.



Figura 3.2. Polvo inteiro (1), corte antes da evisceração (2), polvo eviscerado e escorrido (3) e polvo embalado antes da congelação (4).

3.1.2 Robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*)

No ensaio de seleção dos revestimentos e otimização das condições de aplicação (teste prévio) e nos ensaios em refrigerado foram usados filetes de robalos (calibre 400 - 600 g), provenientes de uma aquacultura do Mediterrâneo. No ensaio em congelado utilizaram-se filetes de robalos (calibre 600 - 800 g) de uma aquacultura nacional (60 peixes em cada um dos ensaios refrigerado e congelado) (Figura 3.3). Todos os filetes (com pele) foram preparados manualmente, em condições adequadas, no IPMA ou em ambiente industrial.



Figura 3.3. Aspeto dos robalos inteiros e dos filetes.

3.2 Preparação do polvo cozido, caldo de cozedura e polvo armazenado em congelado

3.2.1 Seleção das condições de cozedura do polvo

Os polvos congelados no IPMA foram transportados, em condições isotérmicas, para a Empresa Faster Produtos Alimentares Lda., sediada na Lousã, que cumpre as normas Food IFS (International Featured Standards) para proceder à preparação do produto cozido em condições industriais. Previamente foram retirados aleatoriamente três exemplares de polvo para caracterização da matéria-prima (polvo cru congelado). O tempo e a temperatura adequados para cozer o polvo em água sem sal e condimentos foram determinados previamente com 4 polvos descongelados usando um cozedor industrial em inox, com aquecimento a gás, marca Berto's (modelo SBG9-15 I, Pádua, Itália) com 110 L de capacidade, 19,11 kcal/h de poder calorífico superior e um termopar de penetração para alimentos (Marca Testo 105, Cabriils, Espanha com a precisão de 0,5 °C), aprovado de acordo com o Regulamento (CE) 1935/2004 (UE 2004). O processo de cozedura foi otimizado com base nos seguintes critérios: (i) tempo para atingir a temperatura mínima de 75 °C (critério ~microbiológico de segurança) no centro térmico da zona mais anterior dos braços de polvo (correspondente à parte mais grossa) e (ii) tempo para obter uma textura adequada na porção mais grossa dos braços, avaliada por apreciação sensorial. Os polvos foram considerados cozidos ao fim de 45 minutos em água em ebulição

3.2.2 Preparação do polvo cozido e do caldo de cozedura

O processo foi desenvolvido de acordo com o indicado na figura 3.4. Antes do tratamento industrial os dezasseis exemplares foram descongelados durante a noite em câmara refrigerada. Após descongelação os polvos foram colocados em simultâneo dentro do cozedor Berto's, SBG9-15 L, contendo água em ebulição (sem adição de sal ou condimentos), e aí mantidos por um período de 45 min (detalhes na Figura 3.5). A cada 15 min os polvos eram mexidos para que a cozedura fosse o mais homogénea possível e nos intervalos o equipamento era tapado para não haver perdas de calor. A temperatura interna nos polvos foi medida com o termopar Testo 105, para verificar que a

temperatura desejada (75 - 80 °C) tinha sido alcançada. De seguida, os polvos cozidos foram transferidos para um escorredor e, depois de escorridos, arrefecidos em bandejas de inox.

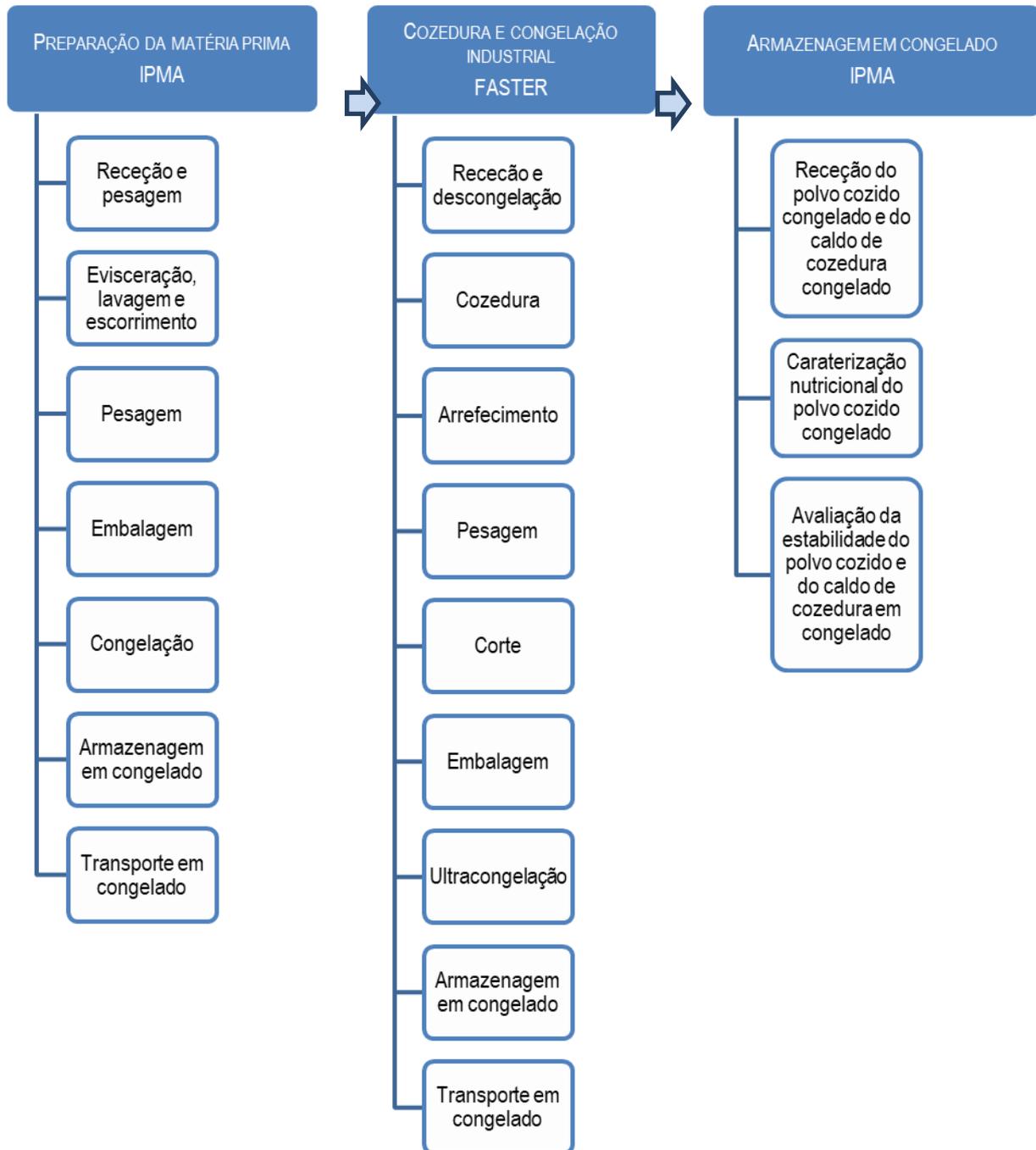


Figura 3.4. Diagrama das operações de preparação do polvo cozido e do caldo de cozedura.

Parte do caldo de cozedura foi recolhido após homogeneização e também arrefecido. Depois do arrefecimento os polvos foram cortados manualmente em duas partes, cada uma constituída por quatro braços e metade do manto, e cada parte acondicionada em cuvette de alumínio (24x12x4 cm: comprimento, largura e altura). Uma parte homogénea do caldo de cozedura (cerca de 300 ml) foi,

depois de arrefecido, colocado em sacos (polietileno de baixa densidade 42,0 X 29,5 cm e 35,0 µm de espessura) que foram selados a quente (dupla selagem) numa máquina de fechar sacos (Marca Carina). Os dois produtos, polvo cozido e água de cozedura (32 unidades de cada), foram arrumados em carrinhos de inox para posterior congelação rápida.

A percentagem do rendimento foi determinada tendo por base o peso da amostra crua e o peso da amostra após a aplicação do método de confeção, segundo a equação: $\text{Rendimento (\%)} = [\text{amostra (g) após tratamento térmico} / \text{amostra (g) crua}] \times 100$. Esta alteração de peso deve-se, principalmente, à perda de água.



Figura 3.5. Aspeto de algumas das operações da preparação do polvo e do caldo de cozedura.

3.2.3 Ultracongelação e conservação do polvo e da água de cozedura

Após cozedura e arrefecimento os dois produtos foram congelados em túnel de ar forçado (marca Bitzer, modelo TYP4DC-724-405) a -35 °C. Depois da congelação rápida, as embalagens dos polvos foram fechadas com tampa cartonada e em conjunto com os sacos de caldo colocadas em caixas de cartão parafinado, num total de quatro unidades por caixa. Estas caixas foram armazenadas numa câmara a -20 °C (marca Centauro, modelo KT1PL2X4PCS-15.2). Na mesma semana os produtos foram transportados em veículo refrigerado até ao entreposto da empresa em Lisboa e de seguida para o IPMA, onde foram armazenados a -18±2 °C (câmara da Marca ERAL, Montijo, Portugal) durante 8 meses. Para controlo das condições de armazenagem (temperatura e humidade), foi colocada uma sonda Kit Eclo Espresso Thermo.

Para avaliação da qualidade durante a armazenagem, foram recolhidas amostras (quatro a seis embalagens de polvo cozido e duas de caldo) após 1, 2, 4, 6 e 8 meses de congelação, através de análises químicas (humidade, gordura livre, proteína bruta, cinza, minerais (macro, micro e tóxicos),

perfil de aminoácidos e de ácidos gordos), físicas (textura instrumental e cor) e sensoriais. As análises microbiológicas foram realizadas apenas após 1, 4 e 8 meses, usando duas embalagens de polvo cozido e duas de caldo.

3.3 Revestimento e conservação de filetes de robalo

3.3.1 Preparação das soluções de revestimento, seleção do revestimento e otimização das condições de aplicação (teste prévio)

Nas soluções de revestimento foi utilizado iota carragenato (CarraSol PG4 5339, Formulab, Lisboa) e quitosano (Sigma, $\geq 75\%$ de grau de desacetilação, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA). A solução de carragenato foi preparada de acordo com Volpe et al. (2015) do seguinte modo: o iota carragenato (0,5, 1 e 1,5 g) foi adicionado a 100 ml de água destilada e homogeneizada sob agitação a 90-100 °C, até completa dissolução e a mistura ficar clara. De seguida armazenou-se à temperatura ambiente até aplicação. A solução de quitosano foi preparada de acordo com Souza et al. (2010) do seguinte modo: o quitosano (0,5, 1,0 e 1,5 g) foi adicionado a 100 ml de uma solução de ácido láctico 1% (Formulab, Lisboa) e homogeneizada sob agitação a 45 °C até completa dissolução. De seguida adicionou-se 1,5 g de glicerol (Formulab, Lisboa) (plasticizante) e 0,2 g de Tween 80 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) (surfatante) e homogeneizou-se durante 10 minutos. De imediato filtrou-se através de papel de filtro W#3 para remover eventuais partículas não solubilizadas e armazenou-se à temperatura ambiente.

Para a otimização das condições de aplicação dos revestimentos usaram-se pedaços uniformes (50-60 g) preparados a partir de filetes (120-150 g cada) de robalo, preparados manualmente no laboratório. Os pedaços foram pesados e de seguida imersos nas soluções de diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 1,5 %) de carragenato e de quitosano durante 10, 30 e 60 segundos. De seguida foram deixados a escorrer durante 5 minutos e a percentagem de revestimento retido (R) calculada, de acordo com a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{M_f - M_i}{M_i} \times 100$$

Sendo M_f a massa dos pedaços de robalo após terem sido revestidos e escorridos e M_i a massa inicial dos pedaços de robalo.

3.3.2 Conservação em refrigerado e em congelado de filetes de robalo revestidos

O processo foi desenvolvido de acordo com o indicado na figura 3.6. Nos ensaios em refrigerado os filetes de robalo foram lavados em água, escorridos e pesados. De seguida os filetes foram divididos em dois lotes, um considerado como controlo (sem revestimento - CTR) e o outro para ser revestido (QUIT) (Figura 3.7).

Os filetes para revestimento foram imersos no revestimento e condições selecionadas e escorridos durante 5 minutos. De seguida os filetes revestidos e os filetes controlo foram acondicionados em

tabuleiros de poliestireno com 22x9x3 cm (comprimento, largura e altura), um filete em cada tabuleiro, sobre absorvente de humidade (Figura 3.7). Cada tabuleiro foi envolvido com película estirável (grau alimentar) e as embalagens armazenadas em refrigerado (câmara vertical de refrigeração Fiochetto Scientific Refrigerators; 3 °C) durante 7 dias.

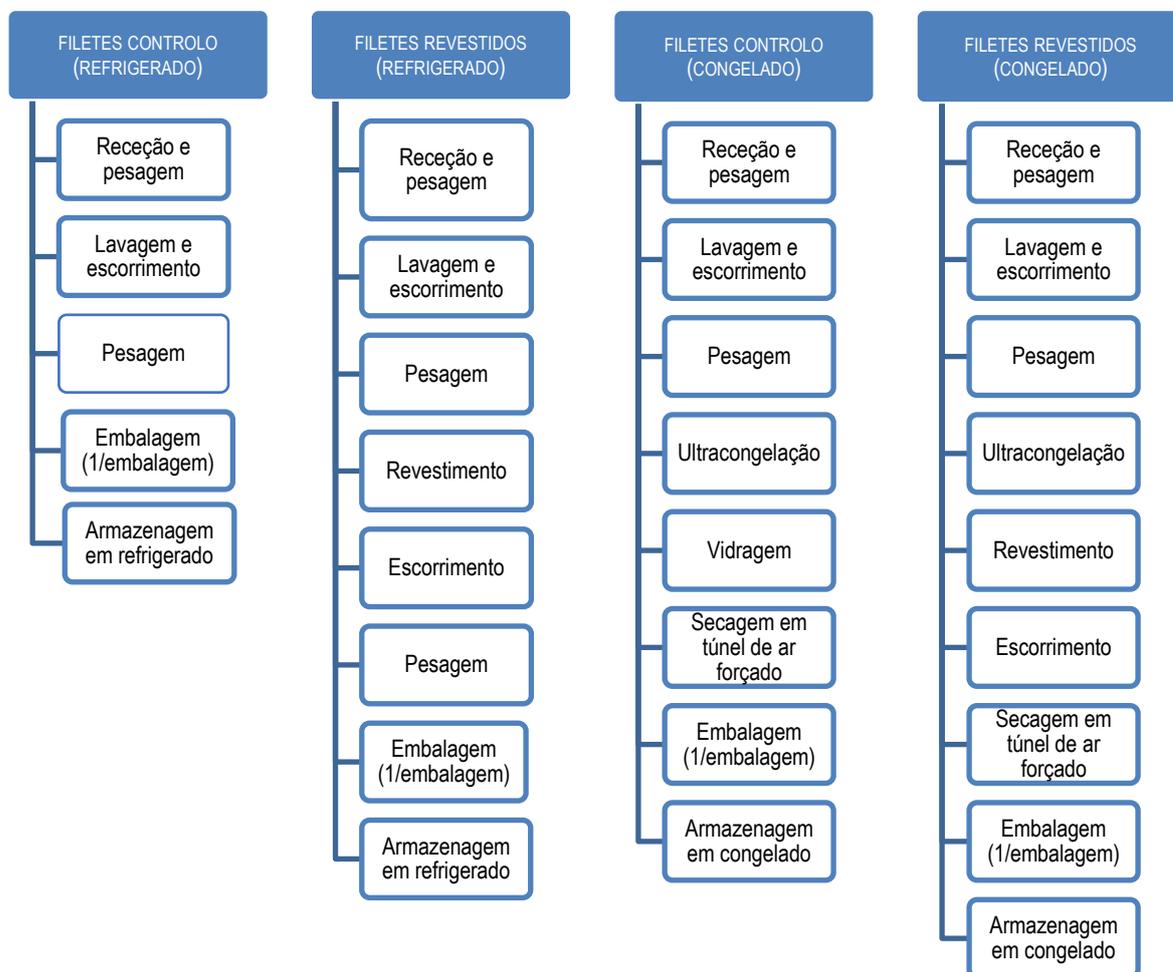


Figura 3.6. Diagrama das operações de preparação de filetes de robalo para conservação em refrigerado e em congelado.

No final do processo, recolheram-se 8 embalagens (8 x 1 filete) do grupo controlo (filetes sem revestimento) para caracterização da qualidade inicial dos filetes: 4 embalagens para análise microbiológica e química (humidade, gordura total, proteína bruta, cinza e compostos azotados voláteis) e as restantes 4 embalagens para análise sensorial e análises físicas (textura instrumental, cor e exsudado). Para avaliação da qualidade durante a armazenagem recolheram-se 6 embalagens de cada grupo após 2, 5 e 7 dias de refrigeração, para análises químicas (humidade e compostos azotados voláteis), físicas (textura instrumental, cor e exsudado), sensoriais e microbiológicas.



Figura 3.7. Aspeto dos robalos e dos filetes sem e com revestimento, embalados em cuvette com absorvente.

Nos ensaios em congelado (Figura 3.6) os filetes de robalo foram lavados em água corrente logo após a preparação, escorridos e pesados. Seguiram depois para congelação (-35 °C) em túnel industrial de criogenia (Praxair 0.6 x 6 m, TBM S.A.) na empresa GELPEIXE (Loures, Portugal). De seguida foram divididos em dois lotes para a vidragem por imersão, um vidro com água a 4 °C e o outro vidro com o revestimento de quitosano selecionado, em sala de temperatura controlada (8 a 10 °C) Os filetes foram imediatamente encaminhados para o túnel de criogenia, para congelação da camada de gelo formada pela vidragem. De seguida os filetes foram embalados (2 filetes por embalagem) em embalagens de politereftalato de Etileno (PET), que foram seladas em máquina seladora Lovero Bag Sealer Sk-410 (Korea), acondicionadas em embalagens de papel cartonado e imediatamente armazenadas em câmara de congelação da GELPEIXE (- 20 °C), durante 14 meses.

No final do processo recolheram-se 3 embalagens (3 x 2 filetes) de cada grupo (CTR e QUIT) para determinação da qualidade inicial dos filetes congelados: composição química (humidade, gordura total, proteína bruta e cinza), análises físicas (textura instrumental, cor, água de vidragem e capacidade de retenção da água), sensoriais e microbiológicas. Durante o período de armazenagem retiraram-se 3 embalagens de cada grupo após 3, 6, 9, 12 e 14 meses, para avaliação da qualidade através das análises referidas. Nos meses 0 (final do processo), 3 e 14 recolheram-se 2 embalagens

extra para controlo da qualidade microbiológica. A qualidade microbiológica da matéria prima foi avaliada usando 4 filetes preparados a partir de 4 robalos, seleccionados aleatoriamente.

3.4 Métodos químicos para avaliação da qualidade

Para avaliação da qualidade das matérias-primas e dos produtos preparados realizaram-se diversas análises químicas. Na realização das diversas análises utilizaram-se reagentes com grau de pureza adequado às diferentes determinações, em geral de grau analítico ou superior, das marcas Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada nas determinações analíticas e na preparação de soluções aquosas foi produzida num aparelho Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, EUA).

Na elaboração das retas de calibração para determinação do perfil em ácidos gordos foram utilizados os padrões Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): PUFA nº1 (fonte marinha, 99%, referência 47033) e PUFA nº 3 (óleo de Menhadem, 99%, referência 47085U). Na determinação dos elementos minerais foram utilizados padrões Inorganic Ventures (Christiansburg, VA, EUA) (solução padrão de iodo, ródio, germânio índio e ítrio), Merck (Darmstadt, Alemanha) (solução padrão de telúrio, potássio, sódio, magnésio, fósforo, ferro, zinco, cobre, manganês, cobalto, vanádio, crómio, níquel, arsénio, cádmio, mercúrio e chumbo) e SCP Science (Marktobendorf, Alemanha) (solução padrão de selénio).

Para todas as determinações foram realizados pelo menos dois ensaios sobre a mesma amostra.

3.4.1 Garantia da qualidade analítica

A qualidade analítica dos diferentes métodos foi avaliada (Quadros 3.1 e 3.2) de acordo com os procedimentos descritos em Magnusson e Örnemark (2014).

Quadro 3.1. Garantia da qualidade dos métodos analíticos da composição química aproximada, ácidos gordos, macro, micro e contaminantes (n=4).

Elementos	Método	DL	Exercício de intercomparação ou material de referência certificado	Certificado ¹	Presente trabalho ²
<i>Composição química aproximada (g/100 g)</i>					
Humidade	Secagem	n.d.		66,64±0,47	66,44±0,12
Cinza	Incineração	0,16		2,12±0,08	2,13±0,01
Azoto	Combustão	0,0004	Teste FAPAS	2,17±0,04	2,20±0,00
Gordura	Extração em Soxhlet	0,1		15,53±0,47	15,88±0,40

Quadro 3.1.(cont.) Garantia da qualidade dos métodos analíticos da composição química aproximada, ácidos gordos, macro, micro e contaminantes (n=4).

<i>Ácidos gordos (g/100 g)</i>					
14:0				0,316±0,009	0,238±0,006
16:0				1,22±0,04	1,14±0,04
16:1				0,816±0,026	0,735±0,023
18:0				0,263±0,011	0,260±0,005
18:1	GC-FID	4x10 ⁻⁶ - 10x10 ⁻⁶	SRM-1946	2,64±0,08	2,39±0,06
18:2n-6				0,348±0,023	0,338±0,009
18:3n-3				0,221±0,025	0,200±0,005
20:5n-3				0,296±0,019	0,304±0,009
22:5n-3				0,335±0,026	0,323±0,024
22:6n-3				0,92±0,10	0,93±0,10
<i>Macroelementos (mg/kg)</i>					
Magnésio	FAAS	0,02	Dorm-4	910±80	835±12
Potássio	FAAS	0,01	Dorm-4	15500±1000	14500±495
Sódio	FAAS	0,09	Teste FAPAS	0,60±0,03	0,55±0,02
Fósforo	MAS	0,01	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Microelementos (mg/kg)</i>					
Cobre	FAAS	0,02	Dorm-4	15,7±0,5	15,4±0,7
Zinco	FAAS	0,06	Dorm-4	51,6±2,8	48,4±1,0
Selénio	ICP-MS	6,4x10 ⁻³	ERM®-BB422	1,33±0,13	1,20±0,02
Iodo	ICP-MS	7,8x10 ⁻³	n.d.	n.d.	Recuperação=111%
<i>Contaminantes (mg/kg)</i>					
Cádmio	GFAAS	0,002	Dorm-4	0,299±0,018	0,298±0,011
Chumbo	GFAAS	0,02	Dorm-4	0,404±0,062	0,412±0,037
Mercúrio	AAS	0,004	Dorm-4	0,412±0,036	0,407±0,049

¹ Os valores são apresentados como média ± incerteza ou ± desvio padrão para ácidos gordos; ² Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. Abreviaturas: DL – Limite de deteção; CRM – Material de referência certificado; n.a. – não aplicável; n.d. – não determinado; GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detetor FID; FAAS – Espectrometria de Absorção Atómica por Chama; MAS – Espectrofotometria de absorção molecular; ICP-MS – Espectrometria de massa Acoplada a Plasma indutivo; GFAAS – Espectrometria de Absorção Atómica em Forno de Grafite; AAS – Espectrometria de Absorção Atómica; Teste FAPAS 01120 – Componentes Nutricionais em Conservas de Carne, janeiro-março de 2018 (Fera Science Ltd., York, Reino Unido); SRM-1946 – Material de referência padrão do Lake Superior Fish Tissue (Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, Canadá); Dorm-4 – Material de referência certificado para proteínas de peixes para metais (Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, Canadá); ERM®-BB422 – Material de referência europeu certificado (músculo de peixe) para selénio.

3.4.2 Preparação das amostras para análise química

No caso do polvo cru, a caracterização da matéria-prima foi realizada em três exemplares. Para caracterização da qualidade dos polvos cozidos ultracongelados foram utilizadas três embalagens independentes, contendo cada uma quatro braços e metade do manto. Para avaliação da qualidade durante a armazenagem em congelado foram utilizadas duas embalagens. Em cada caso, os braços e o manto foram cortados em pequenos pedaços, que foram triturados (5000 rpm) num moinho de dupla lâmina marca Retsch modelo Grindomix GM-200 (Retsch, Haan, Germany) até obtenção de uma mistura homogênea, constituindo-se duas ou três amostras independentes (uma por embalagem, no caso do polvo cozido). De cada amostra, uma parte da massa foi imediatamente usada na determinação da composição química aproximada; outra parte foi congelada a -80°C (New Brunswick Scientific, U410 Premium, New Jersey, USA) até à realização de algumas análises químicas (minerais macro, micro e tóxicos, aminoácidos) e a restante foi congelada a -80 °C para posterior liofilização (a -45 °C a uma pressão de 10⁻¹ atm) em liofilizador Heto (Heto PowerDry LL3000 Freeze Dryer, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) e análise do perfil de ácidos gordos. No caso do caldo de cozedura preparou-se amostra apenas para determinação de sódio, potássio e magnésio.

Quadro 3.2. Garantia da qualidade do método analítico da composição em aminoácidos (hidrólise ácida em condições anaeróbicas seguida de cromatografia líquida - UPLC), usando o material de referência certificado NIST 3244* (n=3).

Aminoácidos (g/100 g)	Limite de deteção	Valor certificado	Valor analisado
		Média±U ¹	Média±SD ²
Alanina	1,13x10 ⁻³	2,12±0,96	2,02±0,01
Arginina	2,49x10 ⁻³	2,26±0,52	2,15±0,19
Aspartato	2,68x10 ⁻³	5,29±0,28	5,00±0,18
Cisteina	3,18x10 ⁻³	0,48±0,14	0,32±0,07
Glutamato	2,82x10 ⁻³	14,3±2,10	14,64±0,28
Glicina	1,01x10 ⁻³	1,23±0,13	1,32±0,08
Histidina	2,78x10 ⁻³	1,73±0,17	1,52±0,07
Isoleucina	0,85x10 ⁻³	3,00±0,61	2,56±0,04
Leucina	1,23x10 ⁻³	6,16±0,88	5,78±0,05
Lisina	3,79x10 ⁻³	4,78±0,77	4,07±0,44
Metionina	2,02x10 ⁻³	1,71±0,28	1,66±0,03
Fenilalanina	3,08x10 ⁻³	3,48±0,50	3,67±0,28
Prolina	0,82x10 ⁻³	6,64±0,73	6,36±0,19
Serina	1,00x10 ⁻³	3,80±0,35	3,16±0,06
Teonina	1,11x10 ⁻³	2,76±0,54	2,28±0,03

Quadro 3.2. (Cont.) Garantia da qualidade do método analítico da composição em aminoácidos (hidrólise ácida em condições anaeróbicas seguida de cromatografia líquida - UPLC), usando o material de referência certificado NIST 3244* (n=3).

Triptofano	$2,53 \times 10^{-3}$	$0,84 \pm 0,29$	$0,51 \pm 0,01$
Tirosina	$3,94 \times 10^{-3}$	$3,16 \pm 0,71$	$3,36 \pm 0,26$
Valina	$0,73 \times 10^{-3}$	$3,67 \pm 0,98$	$3,28 \pm 0,04$

* NIST 3244 - Ephedra – proteína em pó. National Institute of Standards and Technology, Gaithersberg. MD. USA.
¹ Incerteza; ² Desvio padrão.

No caso dos filetes de robalo (inicial, controlo e revestidos) foram preparadas 4 e 3 amostras independentes, correspondentes às embalagens recolhidas durante a armazenagem em refrigerado e congelado, respetivamente. Todas as amostras foram cortadas em pequenos pedaços e triturados (5000 rpm) no moinho de dupla lâmina marca Retsch modelo Grindomix GM-200 e transformados em misturas homogêneas. Parte da massa foi imediatamente usada na determinação da composição química aproximada (exceto gordura total); outra parte foi congelada a -80°C , na arca New Brunswick Scientific, até à realização das restantes análises químicas e a restante foi congelada a -80°C para posterior liofilização (aproximadamente 24 h a -45°C a uma pressão de $\sim 10^{-1}$ atm; liofilizador Heto PowerDry LL3000) para análise de gordura total.

3.4.3 Determinação da humidade

O teor de humidade foi obtido a partir da diferença de massa da amostra antes e após secagem em estufa a $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante, determinado com base no método descrito na NP 2282:2009 (IPQ, 2009a). Pesou-se aproximadamente 10 g de cada amostra (balança Mettler Toledo, AG 245, com precisão de 0,1 mg) para cristalizador de vidro (90 mm de diâmetro e 15 mm de altura), previamente pesado. A seguir o cristalizador foi colocada numa estufa de laboratório Memmert UL 500 (Schwabach, Alemanha) a $104 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e aí mantido durante uma noite para a amostra desidratar. No dia seguinte o cristalizador com a amostra foi colocado num exsiccador para arrefecer durante pelo menos 30 minutos, sendo então pesado. Este procedimento foi repetido as vezes necessárias até a amostra adquirir peso constante. O teor de humidade foi expresso em grama por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.4 Determinação da gordura livre

A determinação da gordura livre foi efetuada por extração da matéria gorda da amostra com éter etílico, seguida de eliminação do solvente por recuperação do solvente no extrator, secagem e pesagem) pelo método Soxhlet em bateria de aquecimento SBS PC 6L, de acordo com o método descrito na NP 1972:2009 (IPQ, 2009b). Pesou-se aproximadamente 5 g de amostra (balança

Mettler Toledo, AG 245, com precisão de 0,1 mg) para papel de filtro e adicionou-se uma quantidade de sulfato de sódio anidro igual à toma para análise. A seguir o papel de filtro foi enrolado até formar uma cartuxa e então colocado dentro dos extratores e coberto com éter etílico. Num balão de fundo raso, previamente seco em estufa a 103 ± 2 °C (Memmert, ULE 500), durante 30 minutos, arrefecido em exsicador e pesado, colocaram-se 80 mL de éter etílico. O extrator foi montado num balão de extração previamente seco em estufa durante 30 minutos, arrefecido em exsicador e pesado, ao qual se adicionou 80 ml de éter etílico. O balão foi colocado no extrator da bateria de aquecimento durante 7 horas à temperatura aproximada de 40 °C e a extração efetuada por várias passagens do solvente com refluxo. Após a extração retirou-se o balão e eliminou-se o solvente, utilizando uma placa de aquecimento a cerca de 35 °C. O balão contendo o extrato foi seco em estufa a 104 ± 2 °C (Memmert, ULE 500), durante 30 minutos e depois colocado num exsicador para arrefecer e aí mantido até peso constante. O teor de gordura livre foi expresso em grama por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.5 Determinação da gordura total

A determinação da gordura total foi efetuada por extração da matéria gorda da amostra liofilizada com uma mistura clorofórmio-metanol, para extração e solubilização de todos os lípidos seguida de eliminação do solvente, de acordo com o método descrito em Folch et al. (1957). Pesou-se aproximadamente 300 mg de amostra (balança Mettler Toledo, AG 245, com precisão de 0,1 mg) para um tubo de vidro de 18 ml e adicionou-se 3 ml de solução de clorofórmio-metanol (CHCl_3 : MeOH, 2/1), agitando-se num agitador vortex. Posteriormente foi adicionado 3 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N e 300 μl de cloreto de magnésio (MgCl) a 0,5 %, contribuindo deste modo para a precipitação das proteínas e migração dos lípidos para a fase orgânica. Centrifugou-se a 2000 g a 4 °C, durante 5 - 10 minutos de modo a garantir uma boa separação da fase aquosa da fase orgânica. Recolheu-se esta última com uma pipeta Pasteur, para um tubo de 8 ml, previamente seco e tarado. Repetiu-se o processo de extração mais uma vez e voltou-se a recolher a fase orgânica para o tubo de 8 ml. O solvente orgânico foi evaporado dos tubos de 8 ml sob atmosfera de azoto e posteriormente pesados. O teor de gordura total foi expresso em grama por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.6 Determinação da proteína bruta

O teor de proteína foi determinado, num analisador de azoto FP-528 LECO (LECO, St. Joseph, EUA), previamente calibrado com EDTA (carbono: $41,07 \pm 0,17$, hidrogénio: $5,55 \pm 0,02$, azoto: $9,57 \pm 0,03$), de acordo com o método de Dumas (Saint-Denis e Goupy, 2004). Pesou-se cerca de 100 mg (balança Mettler Toledo, AG 245, com precisão de 0,1 mg) de amostra húmida em papel de estanho, e selou-se muito bem, de modo a excluir todo o ar. A amostra, foi de seguida, sujeita a combustão a 850 °C e os produtos resultantes da combustão (CO_2 , H_2O , NO_x , N_2) passaram por um filtro e um refrigerador termoelétrico, para que lhes seja retirada toda a humidade. Posteriormente os gases são

homogeneizados e uma alíquota é obrigada a passar por uma coluna de cobre para que todo o oxigênio seja removido e para converter o NO_x em N_2 . O N_2 foi então arrastado por uma corrente de hélio até uma célula de condutividade térmica onde se procedeu à sua quantificação. O teor de azoto total foi convertido em proteína total por aplicação do fator de conversão 6,25, usado no caso de proteínas de origem animal (FAO, 2003). O teor de proteína bruta foi expresso em grama por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.7 Determinação da cinza

A cinza é o resíduo inorgânico, correspondente aos minerais presentes no material biológico após destruição da matéria orgânica. O teor de cinza total foi determinado com base na NP 2032:2009 (IPQ, 2009c). Pesou-se cerca de 5 g da amostra homogeneizada (balança Mettler Toledo, AG 245, com precisão de 0,1 mg), para cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Colocou-se o cadinho em estufa (Memmert ULE 50) a 104 ± 2 °C durante uma noite, para secagem da amostra, e, em seguida, transferiu-se para a mufla (Heraeus, Tipo MR170 E) (Hanau, Alemanha), elevando a temperatura muito lentamente, até 500 ± 25 °C. Após 16 horas (uma noite) de incineração, retirou-se o cadinho da mufla, deixou-se arrefecer em exsiccador e pesou-se. Repetiram-se as operações de incineração, arrefecimento e pesagem até que duas pesagens sucessivas não diferissem entre si em mais de 1,0 mg. O teor de cinza foi expresso em grama por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.8 Determinação do perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado com base no método descrito por Lepage & Roy (1986) modificado por Cohen et al. (1988). Este método baseia-se na transesterificação dos ácidos gordos em ésteres metílicos (FAME) através de catálise ácida, a fim de determinar por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar o perfil de ácidos gordos.

Pesou-se (Mettler Toledo, AG 245) cerca de 300 mg de material liofilizado previamente homogeneizado para tubos de vidro de 15 ml com rosca, adicionou-se 50 μl da solução de padrão interno (C21:0), na concentração de 10 mg/ml e 5 ml da solução metanólica de cloreto de acetilo a 5 % (p/v). Os tubos foram agitados no vórtex (Heidolph, ReAX) durante 60 segundos e colocados em banho-de água (Kötterman, 3047) a 80 °C durante uma hora para que ocorra a esterificação, seguindo-se o seu arrefecimento à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se a cada tubo 1 ml de água e 2 ml de n-heptano e os tubos foram agitados novamente durante 1 minuto em vortex e centrifugados a 3000 g (centrífuga Sigma, 2K 15), durante 3 minutos 4° C. Após centrifugação, fez-se a recolha da fase orgânica (sobrenadante, onde se encontravam os ésteres metílicos) e filtrou-se através de uma coluna de algodão e sulfato de sódio anidro para remoção de alguma fase aquosa.

Injetaram-se 2 μL de amostra num cromatógrafo de fase gasosa (Brucker modelo Scion GC, Livingston, Reino Unido) equipado com amostrador automático e detetor de ionização de chama

(FID). A separação dos ésteres metílicos teve lugar numa coluna capilar de polietilenoglicol, marca DB-Wax (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura), utilizando hélio como gás de arraste. Durante a análise a coluna foi aquecida a 180 °C durante 5 minutos, seguindo-se uma rampa de aquecimento de 4 °C/min, durante cerca de 10 min, até atingir 220 °C, que foi mantida durante 25 min. Os compostos separados foram detectados no detetor FID a 250 °C. O teor de cada ácido gordo foi expresso em percentagem relativa (% do total de ácidos gordos) e em mg por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.9 Determinação de minerais macro, micro e tóxicos

3.4.9.1 *Potássio, sódio, magnésio, cobre e zinco*

Os teores dos diferentes minerais - potássio (K), sódio (Na), magnésio (Mg), cobre (Cu), e zinco (Zn)- foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica de chama, após incineração da amostra e dissolução da cinza em ácido nítrico, com base na metodologia proposta por Jorhem (2000). Pesou-se cerca de 5 g (balança Mettler Toledo, AG 204) das amostras e procedeu-se à sua incineração nas mesmas condições da determinação do teor em cinza. De seguida humedeceram-se as cinzas com ácido nítrico Merck (Darmstadt, Germany) a 65% (p/p) que foi evaporado até à secura sobre uma placa de aquecimento. Os cadinhos foram novamente levados à mufla (Heraeus, tipo MR 170 E), a 400 °C, durante 20 a 30 minutos até obtenção de cinza branca. Aos cadinhos foram então adicionados 6,0 mL de ácido nítrico a 15% (v/v), previamente aquecido, para dissolver as cinzas e, de seguida, transferiu-se, filtrando, para balão de 25 mL. Lavaram-se os cadinhos com 6,0 mL do mesmo ácido e, posteriormente, com água ultrapura (Milli-Q). Deixou-se arrefecer e perpez-se o volume com água ultrapura. As determinações do Na, K, Mg, Cu e Zn foram realizadas por espectrometria de absorção atómica de chama num espectrómetro Spectr AA 55B com correção de fundo de deutério (Varian) (Palo Alto, CA, USA). As concentrações de cada elemento foram calculadas com base em curvas de calibração obtidas pela leitura da absorção de pelo menos cinco diferentes concentrações da respetiva solução padrão dissolvida em 0,5 M HNO₃ (Merck Darmstadt, Germany): Mg (NO₃)₂, KNO₃, NaNO₃, Cu (NO₃)₂ e Zn (NO₃)₂. Os teores de Na, K, Mg, Cu e Zn foram expressos em mg/100 g de amostra de massa fresca.

No caso do caldo de cozedura, usou-se 1 ml de amostra para vaso de digestão, adicionou-se 4 ml de ácido nítrico Merck (Darmstadt, Germany) ultrapuro 65 % e 1 ml de peróxido de hidrogénio 30 % (Merck, Darmstadt, Germany). A mistura foi digerida no micro-ondas CEM modelo MARS 5 a 210 °C durante 15 minutos. A solução digerida foi transferida para balão de 25 ml, perfazendo-se o volume com água ultrapura. Procedeu-se à diluição (cerca de 50 vezes) da solução digerida para determinação de Na, K e Mg por espectrometria de absorção atómica de chama no espectrómetro Spectr AA 55B. Os teores de Na, K e Mg foram expressos em mg/L.

3.4.9.2 *Fósforo*

O fósforo foi determinado pelo método espectrofotométrico UV-Vis de acordo com a norma ISO

13730:1996 (ISO, 1996) num espectrofotómetro UNICAM UV/Vis UV2 (ATI UNICAM, Cambridge, Reino Unido). As amostras, aproximadamente 5 g (balança Mettler Toledo, AG 204) foram incineradas nas condições anteriormente referidas (3.4.9.1) e dissolvidas em HCl 20% (p/v) Merck (Darmstadt, Germany). Posteriormente, transferiu-se, através de filtração, para balão de 25 mL e aferiu-se com água ultrapura. Preparou-se então a mistura reacional, adicionando à amostra uma solução de vanadato de amónio e molibdato de amónio. O fósforo reage com esta solução originando a formação de um composto amarelo com um máximo de absorção a 430 nm, comprimento de onda a que se efetuou a leitura da absorvância. A concentração de fósforo foi determinada por comparação com uma curva de calibração, obtida através da leitura da absorvância a 430 nm de misturas reacionais, preparadas da forma anteriormente descrita, mas substituindo a amostra por 5 soluções de fósforo de concentração conhecida, preparadas a partir de uma solução padrão de fosfato. Os resultados foram expressos em mg/100 g de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.9.3 *Iodo e selénio*

Os teores em iodo e selénio foram determinados por ICP-MS, a partir das amostras liofilizadas. O iodo foi determinado após digestão alcalina da amostra com hidróxido de tetrametilamónio (25%, v/v) em bloco de grafite a 90 °C, durante 3 horas, de acordo com a ES EN 15111:2007 (CEN, 2007). A determinação do selénio foi efetuada de acordo com a BS EN 15763:2009 (CEN, 2009), por digestão da amostra com ácido nítrico (65%, p/p) num microndas (Ethos 1, Milestone) em vaso fechado. O programa de microndas foi otimizado e estabelecido (15 minutos para levar a temperatura até 160 °C, 10 minutos a 160 °C e 90 minutos para arrefecer). Os teores em iodo e selénio foram determinados num ICP-MS, Thermo série X II (Thermo Scientific), (Waltham, MA, EUA) equipado com um amostrador automático Cetac ASX-520, nebulizador de vidro concêntrico de 1 mL.min⁻¹, câmara de nebulização de quartzo refrigerada a ar e injetor de quartzo de 1,5 mm. Os dois elementos foram quantificados, recorrendo a curvas de calibração com coeficientes de correlação superiores a 0,9995 através do uso do software X series Plasma Lab 2.5 Na determinação do iodo utilizaram-se soluções padrão de ródio (10 mg/L) e de telúrio (1000 mg/L) como padrões internos. Na determinação de selénio, utilizaram-se soluções padrão de germânio, índio e ítrio (1000 mg/L) como padrões internos. Os teores de iodo e selénio foram expressos em mg/kg de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.9.4 *Mercúrio total*

O teor de mercúrio total foi determinado por espectrometria de absorção atómica, utilizando um analisador automático de mercúrio (LECO AMA254 Mercury Analyzer, St. Joseph, Michigan, EUA), baseado no método descrito na norma US EPA 7473 (EPA, 2007). Este método consiste na decomposição térmica da amostra, retenção selectiva do mercúrio numa amálgama de ouro a qual, após aquecimento, liberta o mercúrio sob a forma de vapor. O mercúrio é então arrastado, por uma

corrente de oxigénio, até à célula do espectrofotómetro, procedendo-se à leitura da absorção no comprimento de onda de 253,7 nm.

As amostras liofilizadas foram colocadas numa barquinha de níquel, tendo, de seguida, sido adicionado óxido de alumínio até as amostras ficarem cobertas. Posteriormente, colocou-se a barquinha no analisador de mercúrio e efetuou-se a leitura da absorção no comprimento de onda de 253,7 nm. Efetuou-se um ensaio em branco utilizando apenas óxido de alumínio. O teor em mercúrio foi calculado por comparação com uma curva de calibração, efetuada com 9 concentrações diferentes de solução padrão. Os teores de mercúrio foram expressos em mg/kg de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.9.5 *Cádmio e chumbo*

Os teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica em forno de grafite, Varian Spectr AA 220Z (Varian, Palo Alto, CA, EUA) (correção Zeeman ($\lambda=228.8$ e 283.3 nm para o Cd e Pb, respetivamente), após digestão ácida, de acordo com a NP EN 14084 (CEN, 2003). Pesou-se cerca de 1 g de amostra para vaso de digestão, adicionou-se 4 ml de ácido nítrico Merck (Darmstadt, Germany) ultrapuro 65 % e 1 ml de peróxido de hidrogénio 30 % (Merck, Darmstadt, Germany). A mistura foi digerida no microondas CEM modelo MARS 230/60 a 210 °C durante 15 minutos. A solução digerida foi transferida para balão de 25 ml, perfazendo-se o volume com água. A leitura foi feita no espectrofotómetro de absorção atómica em forno de grafite. As concentrações foram calculadas através de uma calibração linear obtida a partir das absorvâncias de, pelo menos, cinco concentrações diferentes de soluções padrão de Cd(NO₃)₂ e Pb(NO₃)₂ (dissolvidas em 0,5 M HNO₃ Merck): Os teores de cádmio e chumbo foram expressos em mg/kg de amostra de massa fresca da parte edível.

3.4.10 Determinação do perfil de aminoácidos

O perfil em aminoácidos foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), após hidrólise ácida das proteínas (HCl 6N, contendo 0,5% fenol) e em condições de anerbiose. As condições de hidrólise ácida com adição de fenol e a total exclusão de oxigénio permitem uma recuperação considerável de aminoácidos sulfurados e do triptofano (Muramoto & Kamiya, 1990).

Nesta determinação utilizou-se o sistema Waters® AccQ Fluor reagente Kit (Milford, MA, EUA), contendo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato como agente de derivatização, tampão de diluição da amostra, eluente A (AccQTag ultra eluent A: formato de amónio em água/acetonitrilo/ácido fórmico = 84:10:6) e eluente B (AccQTag ultra eluent B: ácido fórmico 2% em acetonitrilo). O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mota et al. (2016).

Pesou-se cerca de 20 mg de amostra liofilizada para frascos de digestão de quartzo e em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico (6 N), contendo 0,5% de fenol e 200 µL de padrão interno (25

mM de D-Norvalina). A hidrólise das proteínas foi realizada utilizando um sistema de digestão por microndas (Milestone ETHOS 1 Series) sob condições anaeróbias (bomba de vácuo seguida do fluxo de azoto) a 160 °C, durante 10 minutos (15 minutos para aumentar a temperatura até 160 °C, 10 minutos a 160 °C e 90 minutos para arrefecer). Após a hidrólise completa, os extratos foram neutralizados com 1 mL de hidróxido de sódio (6 N), o volume foi aferido a 10 mL com água desionizada, sendo então os extratos filtrados por filtro de papel. A derivatização foi efetuada adicionando, num frasco de amostra para cromatografia, 10 µL de amostra, 80 µL de tampão de diluição e 20 µL de reagente de derivatização reconstituído. A mistura foi agitada em vortex e aquecida a 55 °C durante 10 minutos.

A separação dos aminoácidos derivatizados foi realizada num sistema Acquity UPLC da Waters®, equipado com uma coluna BEH C18 (100 mm x 2,1 mm de diâmetro interno, 1,7 m; Waters), usando como fase móvel os eluentes A e B no seguinte gradiente: 0–0,54 min, 99,9% A–0,1% B, 5,74 min, 90, 9% A–9,1% B, 7,74 min, 78,8% A–21,2% B, 8,04 min, 40,4% A–59,6% B, 8,70–10 min, 99,9% A–0,1% B. A corrida cromatográfica teve uma duração de 10 minutos, com caudal de 0,7 mL/min. A temperatura da coluna foi de 55 °C e o volume injetado foi de 1 µL. A detecção foi realizada num detector de matriz de fotodíodos a 260 nm.

A identificação e quantificação dos diversos aminoácidos foi efetuada por comparação com curvas de calibração, efetuadas com diluições apropriadas da mistura padrão de aminoácidos (Amino Acid Standard Hydrolysate, Waters®, 2,5 mM em histidina, isoleucina leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, cisteína, tirosina, glicina, arginina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina e serina) (Waters®, Milford, MA, EUA), misturada com o padrão triptofano fornecido pela Sigma (St. Louis, MO, EUA) e padrão interno (D-Norvalina, Waters®, Milford, MA, EUA). Os cálculos foram efetuados utilizando o software empower da Waters®. Os resultados foram expressos em mg de cada aminoácido por 100 g de amostra de massa fresca da parte edível e também em mg por g de proteína.

3.4.11 Determinação de compostos azotados voláteis

As concentrações de azoto básico volátil total (ABVT) e de azoto de trimetilamina (ATMA) foram determinadas respetivamente de acordo com a NP 2930 (IPQ, 2009d) e NP1841-1 (IPQ, 2009e), segundo o método de micro difusão modificado, descrito por Cobb et al. (1973), usando uma amostra húmida de 10 a 25 g. A extração foi efetuada com uma solução de TCA Merck (Darmstadt, Alemanha) a 10%, numa proporção de 1:2 (m/v), num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG), durante 1 minuto. O extrato foi filtrado por papel de filtro Whatman 2V, analisado de imediato ou armazenado a -80 °C até posterior determinação analítica. Para a parte exterior das células mediu-se 1 ml do extrato, adicionou-se 1 ml de água destilada e 1 ml de uma solução saturada de carbonato de potássio Merck (Darmstadt, Alemanha) e ainda 1 ml de formaldeído Merck (Darmstadt, Alemanha) a 37 % no caso do ATMA. Para a coroa central das células de Conway mediu-se 1 ml de uma solução de ácido bórico Merck (Darmstadt, Alemanha) a 1 %, contendo 0,033 % dos indicadores Merck (Darmstadt, Alemanha) verde de bromocresol e 0,066 % de vermelho de metilo. 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 Merck (Darmstadt, Alemanha) 0,02 N e 0,005 N, respetivamente no caso do ABVT e ATMA, até aparecimento da cor rosa. Em paralelo efetuou-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. Este teste foi apenas usado nos ensaios de robalo. Os teores de ABVT e ATMA foram determinados de acordo com a expressão seguinte e expressos em mg/ 100 g de massa de amostra de parte edível.

$$\text{ABVT/ATMA (mg/100 g)} = (21 \times V_2 - V_0) \times (V_{\text{TCA}} + (m \times H/100)) / ((V_1 - V_0) \times V_3 \times m)$$

Sendo:

V₀ - Volume de HCl gasto na titulação do ensaio em branco (ml)

V₁ - Volume HCl gasto na titulação do ensaio de controlo de difusão (ml)

V₂ - Volume de HCl gasto na titulação do ensaio com o extrato da amostra (ml)

V₃ - Volume de extrato da amostra utilizado na determinação (ml)

V_{TCA} - Volume de TCA usado na preparação do extrato (ml)

m - Massa da amostra utilizada na preparação do extrato (g)

H - Humidade da amostra (%)

3.4.12 Retenção de nutrientes e contaminantes

A taxa de retenção (TR) mede a proporção do nutriente ou de contaminante que fica retida no alimento cozinhado, quando comparado com o teor do nutriente no alimento em cru. A determinação da retenção real dos nutrientes quantificados nas amostras de polvo foi efetuada segundo Murphy et al. (1975), através da seguinte equação:

$$\text{TR (\%)} = (A \times B / C \times D) \times 100$$

Sendo:

A - Teor de nutriente/ contaminante presente nas amostras após tratamento térmico (g)

B - Massa das amostras após tratamento térmico (g)

C - Teor de nutriente/ contaminante determinado nas amostras sem tratamento térmico (g)

D - Massa das amostras antes da aplicação do tratamento térmico (g)

3.5 Cálculo de parâmetros nutricionais

3.5.1 Valor energético

O valor energético foi calculado utilizando os fatores de conversão energética recomendados pela FAO (2003) e apresentados no Anexo XIV do Regulamento 1169/2011 (UE, 2011), referente à informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. Assim, de acordo com a literatura devem ser utilizados os fatores 4 kcal/g para as proteínas, 4 kcal/g para os hidratos de carbono e 9 kcal/g para os lípidos. Estes fatores baseiam-se no calor de combustão de proteínas, gorduras e açúcares, corrigidos para as perdas energéticas associadas à digestão e metabolismo dos vários nutrientes (FAO, 2003). Os hidratos de carbono ou foram calculados por diferença ou considerados irrelevantes pelo facto de o pescado apresentar quantidades insignificantes (Huss, 1995). O valor energético foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Valor energético (kcal/100 g)} = (\text{G\%} \times 9 \text{ kcal/g}) + (\text{P\%} \times 4 \text{ kcal/g}) + (\text{HC\%} \times 4 \text{ kcal/g})$$

Sendo:

G% – Percentagem de gordura

P% – Percentagem de proteína

HC% - Percentagem de hidratos de carbono

O valor energético foi também determinado em kJ, multiplicando os valores expressos em kcal por 4,18.

3.5.2 Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT)

Para avaliar a aptidão da gordura das espécies estudadas para influenciar a incidência de doença cardíaca coronária calcularam-se os índices aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT). Estes índices foram calculados com base nos valores absolutos (mg/100 g) de alguns ácidos gordos envolvidos nos processos pró- ou anti-inflamatórios. O cálculo dos índices IA e IT foi efetuado através das fórmulas descritas por Ulbricht e Southgate (1991):

$$\text{IA} = ((12:0) + (4 \times 14:0) + (16:0)) / ((\sum n6\text{PUFA}) + (\sum n3\text{PUFA}) + (\sum \text{MUFA}))$$

$$\text{IT} = (14:0 + 16:0 + 18:0) / ((0,5 \times \sum \text{MUFA}) + (0,5 \times \sum n6\text{PUFA}) + (3 \times \sum n3\text{PUFA}) + (\sum n3\text{PUFA} / \sum n6\text{PUFA}))$$

Sendo:

$\sum n6\text{PUFA}$ = Somatório dos ácidos gordos polinsaturados da família $\omega 6$ (mg/100 g)

$\sum n3\text{PUFA}$ = Somatório dos ácidos gordos polinsaturados da família $\omega 3$ (mg/100 g)

$\sum \text{MUFA}$ = Somatório dos ácidos gordos monoinsaturados (mg/100 g)

3.5.3 Índice de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos (h/H)

O cálculo do índice de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos (h/H) foi estabelecido com base no conhecimento do efeito de alguns ácidos gordos no metabolismo do colesterol (Santos-Silva et al., 2002). O índice h/H foi determinado com base na equação descrita por Santos-Silva et al. (2002):

$$(h/H) = (18:1n9 + 18:2n6 + 20:4n6 + 18:n3 + 20:5n3 + 22:6n3) / (14:0 + 16:0)$$

3.5.4 Índice de polienos

O cálculo do índice de polienos (PI) foi usado como uma estimativa da degradação dos PUFA (Lubis e Buckle, 1990) durante a armazenagem em congelado, de acordo com a seguinte expressão:

$$PI = (20:5n3 + 22:6n3) / 16:0$$

3.5.5 Índice de aminoácidos essenciais (Essential amino acid score)

O índice de aminoácidos essenciais (IAAE) foi determinado em relação aos valores de referência correspondentes às necessidades diárias em aminoácidos essenciais para adultos. Este índice é dado pela razão entre o conteúdo de cada aminoácido essencial nas proteínas das espécies estudadas e as necessidades diárias para adultos de cada um desses aminoácidos, de acordo com a equação:

$$IAAE (\%) = (\text{Miligrama do aminoácido essencial por grama de proteína} / \text{Necessidade diária do aminoácido essencial em miligrama}) \times 100$$

3.6 Métodos físicos para avaliação da qualidade

3.6.1 Determinação instrumental da textura no polvo cozido

Foram realizados dois testes imitativos, o teste de dupla compressão (simulação da mastigação) ou perfil de textura (sigla inglesa TPA – Texture profile analysis) e o teste da dentada/mordida ou "Bite Jaw" (simulação da dentada pelos incisivos) (Careche e Barroso, 2009), usando um analisador de textura TA.XTPlus (Stable Micro Systems, Surrey Reino Unido), equipado com uma célula de carga de 30 kg. Usaram-se duas metades de polvo, provenientes de duas embalagens independentes, das quais se separaram os braços. De cada braço utilizou-se a parte anterior (correspondente à maior espessura), cortada em pedaços de dimensões idênticas, para aplicação do teste TPA e o segmento

posterior para o teste de dentada "Bite Jaw". Foi retirada a pele de todos os pedaços de polvo, que foram codificados de acordo com a embalagem e braços respetivos (Figura 3.8).

O teste TPA foi realizado utilizando um prato de compressão em alumínio, de 50 mm de diâmetro, velocidade de deslocação a 2 mm/s e compressão correspondente a 60% da altura da amostra. Este teste permite determinar as características primárias do produto (dureza (N), adesividade (N.mm), coesividade e elasticidade) e secundárias, como a mastigabilidade (N)). Os resultados correspondem ao valor médio das determinações válidas realizadas em pedaços com $19,5 \pm 0,6$ e $21,3 \pm 1,4$ mm de altura e diâmetro, respetivamente (N total = 4).

No caso do teste da mordida (Bite Jaw), do segmento posterior de cada braço foi recolhido um pedaço de aproximadamente 1 cm de diâmetro e comprimento, ajustado à utilização do teste. A amostra foi centrada na parte inferior da célula, correspondente à mandíbula inferior e a parte superior deslocou-se na amostra a uma velocidade de 2 mm/s. O teste foi realizado em modo de compressão, com tensão de carga de 97%. A ação de morder é dada pelo movimento compressivo da lâmina superior que corta a amostra. Este teste permite avaliar o corte com os dentes incisivos, refletindo o grau de cozedura do polvo, através de dois parâmetros, tenrura (dada pela área sob a curva (N.s)) e firmeza (N). Os resultados correspondem à média das determinações válidas realizadas nos pedaços de 1 cm^2 de secção (N total = 4).

3.6.2 Determinação instrumental da textura em filetes de robalo revestidos

Foram utilizados 6 filetes de cada grupo (provenientes de 6 e 3 embalagens no caso dos filetes refrigerados e congelados, respetivamente). A textura foi medida na parte dorsal do filete (altura média de 20 mm) (idêntica à amostra que foi avaliada na análise sensorial) como se ilustra na figura 3.8).

A determinação da dureza dos filetes de robalo foi efetuada recorrendo a um teste de compressão simples, no analisador de textura TA.XTPlus equipado com a célula de carga de 30 kg, e uma sonda esférica P/0.5S de 12,5 mm de diâmetro, com uma velocidade de deslocação de 1 mm/s e compressão correspondente a 35% da altura do filete (Figura 3.8).

3.6.3 Determinação instrumental da cor

A determinação da cor do caldo de cozedura e dos filetes de robalo foi efetuada com um colorímetro portátil CR-410 (Konica Minolta Camera, Co, Japão), calibrado com uma placa padrão branca ($L^* = 97,79$; $a^* = -0,02$; $b^* = 1,84$), iluminante padrão D65, observador padrão 2° , sistema CIE- $L^*a^*b^*$ em que L^* corresponde à variação da luminosidade, variando do escuro ($L=0$) ao claro ($L^*=100$) ao preto ($L^*= 0$), a^* indica a variação entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos) e b^* indica a variação entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Sant'Anna et al., 2013).

No caso do caldo de cozedura do polvo, os sacos foram dobrados de modo a concentrar o líquido dentro do saco e permitir uma melhor justaposição do colorímetro sobre a superfície dos sacos (evitando a entrada de luz), tendo-se efetuado cinco leituras consecutivas em cada saco.

No caso dos filetes de robalo (6 filetes por grupo em cada dia de amostragem), a cor foi lida apenas na zona muscular do filete, na parte dorsal e na ventral realizando três leituras consecutivas em cada uma das zonas selecionadas.



Figura 3.8. Aspeto do analisador de textura TA.XT.plus (Stable Micro Systems) e das amostras de polvo e robalo a analisar respetivamente.

Foram calculados os seguintes parâmetros, de acordo com Schubring (2009), Sant'Anna et al. (2013) e (Kalinowski et al. 2005): croma, que representa a intensidade/saturação da cor do alimento, tonalidade (H - expressa em graus) que indica a cor e o índice de brancura (W) que indica a brancura da superfície do alimento, usando as seguintes expressões:

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

$$\text{Tonalidade } H (^{\circ}) = \arctan(b^{*}/a^{*})$$

$$\text{Índice de brancura } W = 100 - \sqrt{[(100-L^{*})^2+a^{*2}+b^{*2}]}$$

3.6.4 Determinação do teor de água de vidragem

A água de vidragem foi determinada nos filetes de robalo revestidos congelados (provenientes de 3 embalagens), de acordo com a norma NP 4355 (IPQ, 2002). Os filetes foram retirados de cada embalagem, pesados de imediato, imersos em água a 20 °C, durante cerca de um minuto (até a camada de gelo desaparecer), secos (sem pressionar) com um pano turco e novamente pesados. O teor da água de vidragem (V), por embalagem, foi calculado a partir da fórmula seguinte:

$$V (\%) = (M_i - M_f) \times 100/M_i$$

Sendo:

M_i - massa dos filetes congelados (g)

M_f - massa dos filetes escorridos (g)

3.6.5 Determinação da capacidade de retenção da água

A capacidade de retenção da água (WHC) foi determinada apenas nos filetes de robalo revestidos congelados (provenientes de 3 embalagens), segundo o método descrito por Sánchez-González et al. (2008). Cada amostra analisada (aproximadamente 2 g) era composta por 3 pedaços independentes que foram cortados em pequenos cubos (3x3x3 mm), embrulhados em dois papéis de filtro Whatman No.1 sobrepostos (previamente pesados) e centrifugados a 3000 g (43,7 rpm) por 10 minutos a 18 ° C (Kubota 6800, Kubota Corp., Tóquio, Japão). Após a centrifugação, a amostra foi removida e os papéis de filtro foram pesados novamente. A WHC das amostras foi calculada com base na massa de água absorvida pelo papel de filtro e expressa como a quantidade de água retida pela amostra usando a seguinte equação:

$$WHC (\%) = 100 \times \left[W_s \times \left(\frac{H}{100} \right) - (W_f - W_i) \right] / \left[W_s \times \left(\frac{H}{100} \right) \right]$$

Sendo:

W_s a massa da amostra (cerca de 2 g)

W_f e W_i a massa do papel de filtro após e antes da centrifugação, respectivamente

H a humidade da amostra expressa em %

3.6.6 Determinação do exsudado

A quantidade de exsudado, expressa em %, foi calculada, em cada dia de amostragem, através da diferença de massa das embalagens (cuvette + absorvente humidade) com e sem o exsudado dos filetes (revestidos refrigerados), através da seguinte expressão:

$$\text{Exsudado (\%)} = ME_f - ME_i / MF \times 100$$

Sendo:

ME_f - massa final da embalagem (cuvette + absorvente humidade+ exsudado) (g)

ME_i - massa inicial da embalagem (cuvette + absorvente humidade) (g)

MF - massa do filete em cada embalagem (g)

3.7 Métodos sensoriais para avaliação da qualidade

A avaliação sensorial de polvo cozido, caldo de cozedura do polvo, pratos de polvo (polvo à lagareiro e arroz de polvo) e dos filetes de robalo foi realizada na sala de provas do laboratório de análise sensorial do IPMA (Figura 3.9), equipada com ar condicionado e cinco cabines de prova individuais (equipados com luz branca, água e uma pileta) (Martinsdóttir et al., 2009a, Meilgaard et al., 2016). Foi utilizado o painel sensorial treinado do IPMA, constituído por 10 elementos, de ambos os sexos, não fumadores, com idades compreendidas entre os 30 e os 60 anos. Foram usadas escalas descritivas (Martinsdóttir et al., 2009b; Meilgaard et al., 2016) para avaliação da intensidade dos atributos sensoriais selecionados para cada caso (Anexos 1 e 2).



Figura 3.9. Aspeto de uma cabine individual de prova

3.7.1 Polvo cozido ultracongelado

O painel foi composto por oito provadores, de ambos os sexos, na faixa etária 30 a 56 anos. Utilizaram-se as metades de polvos provenientes de duas embalagens. Da parte anterior de cada braço (equivalente à usada no teste TPA) foram cortados pedaços de 4 cm e três rodela de 0,5 cm. Do segmento posterior (equivalente ao usado no teste de mordida) foram cortadas três rodela de 0,5 cm (Figura 3.10 a).

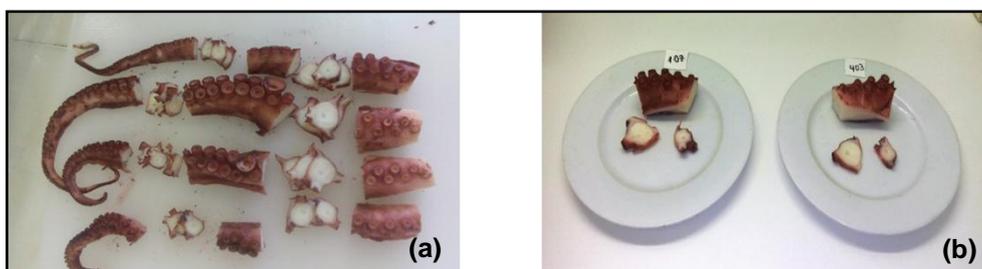


Figura 3.10. Amostras de polvo para a análise sensorial (a). Aspeto da amostra apresentada aos provadores (b).

As amostras foram apresentadas à temperatura ambiente, em pratos de cor branca, codificados. Em cada prato foi colocado um pedaço de 4 cm e duas rodelas de 0,5 cm, uma do segmento anterior e outra do segmento mais posterior (Figura 3.10 b). O pedaço maior foi usado para melhor avaliação da cor, integridade da pele e desidratação e as rodelas para avaliação do grau de cozadura, sabor, suculência e tenrura. Cada provador recebeu dois pratos, correspondentes às duas amostras provenientes de duas embalagens. Os atributos e parâmetros avaliados foram: cheiro (caraterístico/alterado), integridade da pele, cor da pele (caraterística/alterada), desidratação (pele e/ou músculo), grau de cozadura, textura (tenrura e suculência), sabor (caraterístico/alterado e sabor a sal). Foi usada uma escala de intensidade de 5 pontos, variando de ausente (1) a muito intensa (5) (ver Anexo 1).

3.7.2 Caldo de cozadura do polvo

Foram realizadas sessões prévias para selecionar os melhores descritores para a caracterização sensorial do caldo (Figura 3.11a) e treino de três provadores, dois dos quais já com experiência em caldo de cozadura de polvo. Para as sessões de prova descongelaram-se, previamente em arca refrigerada, dois sacos de caldo. Foram colocados 200 ml de caldo, de cada amostra, em copos transparentes codificados (Figura 3.11b). Os caldos foram avaliados após aquecimento durante 2 minutos na potência 600 W num micro-ondas marca Moulinex (Figura 3.11c). Foram avaliados o cheiro (caraterístico/alterado), cor (caraterística/alterada) e sabor (caraterístico/alterado e a sal), usando uma escala de intensidade de 5 pontos, variando de ausente (1) a muito intensa (5) (ver Anexo 1).

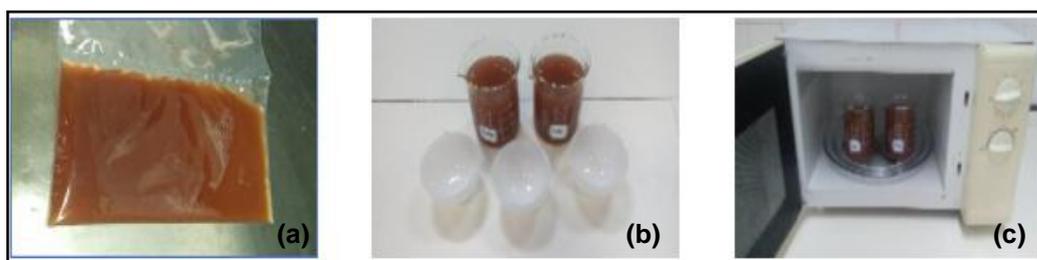


Figura 3.11. Caldo usado para seleção de descritores (a). Caldos usados na análise sensorial (b). Caldos pós aquecimento (c).

3.7.3 Pratos à base de polvo cozido e caldo de cozadura

Os pratos preparados foram apresentados a um painel de quatro provadores, de ambos os sexos, na faixa etária 30 a 56 anos, que avaliaram diversos atributos, usando a escala descritiva de 5 pontos (ver anexo 1). Foi ainda pedida a opinião sobre a adequabilidade dos produtos (polvo cozido e caldo) ao prato testado.

3.7.4 Filetes de robalo - seleção do revestimento a usar (teste prévio)

Os pedaços de filetes de robalo revestidos com as diferentes soluções de revestimento (carragenato e quitosano, nas condições testadas) foram avaliados no dia seguinte ao da aplicação, tendo sido mantidos em arca a 3 °C. A avaliação qualitativa foi realizada por quatro elementos da equipa (faixa etária 32 - 70 anos), e consideraram-se os seguintes parâmetros: cor, granulosidade na superfície, consistência aparente, brilho e o cheiro.

3.7.5 Filetes de robalo revestidos conservados em refrigerado e congelado

Em cada dia de amostragem, foram utilizados 4 e 6 filetes, provenientes de 4 (4 x 1 filete) e de 3 embalagens (3 x 2 filetes), no caso de filetes refrigerados e congelados, respetivamente. Os filetes congelados foram previamente descongelados em arca refrigerada (3 ± 2 °C). Os filetes foram avaliados após cozedura, exceto no caso dos filetes refrigerados que também foram avaliados crus.

Os filetes refrigerados foram avaliados crus (Figura 3.12) por três elementos da equipa (faixa etária 32 - 55 anos) tendo em conta o aspeto e o cheiro, usando uma escala descritiva de 9 pontos, variando de ausente (0) a muito intenso (8) (ver Anexo 2).

A avaliação em cozido foi realizada em porções, retiradas da zona de maior espessura dos filetes (com altura idêntica aos pedaços usados na determinação instrumental da textura), com cerca de 2 cm de largura, individualmente envoltas em folha de alumínio (papelote) de grau alimentar e cozidas a vapor, durante 7 minutos, no forno Rational Combi-master CM6. As amostras foram apresentadas em pratos brancos codificados, nas duas combinações possíveis. O painel sensorial, composto por quatro (filetes refrigerados) e seis provadores (filetes congelados), de ambos os sexos na faixa etária 32 a 56 anos, avaliou a intensidade dos atributos cheiro (caraterístico/alterado), aspeto (caraterístico/alterado), sabor (caraterístico/alterado) e textura, usando a escala de intensidade de 9 pontos, variando de ausente (0) a muito intenso (8) (ver anexo 2).



Figura 3.12. Aspeto geral da preparação e avaliação sensorial dos filetes cozidos.

3.8 Métodos microbiológicos para avaliação da qualidade

Para avaliação da qualidade microbiológica das matérias-primas e dos produtos preparados realizaram-se colheitas de amostras que foram conservadas a 3 ± 2 °C até à sua preparação, de acordo com a norma ISO 7218 (ISO, 2013b). No caso de matérias primas e produtos congelados (polvo cru, polvo cozido, caldo de cozedura e filetes de robalo congelados) procedeu-se à descongelação prévia em arca a 3 ± 2 °C.

No caso do polvo cru e dos produtos de polvo (polvo cozido e caldo de cozedura, congelados durante 1, 4 e 8 meses) constituíram-se amostras independentes de três exemplares e de cada embalagem (duas embalagens de polvo e duas de caldo), respetivamente. Foram realizadas as seguintes determinações: enumeração de microrganismos viáveis totais a 30 °C (sigla inglesa TVC - total viable counts), *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *Escherichia coli* e de mesófilos aeróbios totais esporulados.

Para controlo dos filetes revestidos refrigerados, em cada dia de amostragem (inicial, 2, 4 e 7 dias) foram constituídas duas amostras independentes (correspondentes a cada embalagem, exceto no dia inicial, em que cada amostra foi composta por dois filetes, provenientes de duas embalagens) para as seguintes determinações: enumeração de TVC a 22 °C, microrganismos produtores de H₂S, *Pseudomonas* spp. e de *Enterobacteriaceae*.

No caso dos filetes revestidos congelados (inicial, 2, 3 e 14 meses), foram constituídas duas amostras independentes (correspondentes a duas embalagens, cada uma com dois filetes). No caso da matéria prima (robalo fresco) as duas amostras foram compostas por filetes recolhidos de quatro robalos frescos, selecionados aleatoriamente do lote. Foram realizadas as seguintes determinações: enumeração de TVC a 30 °C e de *Enterobacteriaceae*.

As amostras foram preparadas de acordo com a norma ISO 6887-3 (ISO, 2017): colocaram-se pequenos pedaços das amostras em sacos estéreis com adição de diluente (1:9) para preparação da suspensão mãe; homogeneizou-se num agitador "Stomacher" (Colwoth 400), durante 1 minuto e foram preparadas diluições decimais para as diferentes determinações. No caso do caldo de cozedura do polvo não se procedeu à preparação da suspensão-mãe.

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

Foi determinado o número de microrganismos por contagem direta das colónias. O limite de quantificação foi de 10 ufc/g e 1 ufc/ml, no caso do caldo de cozedura. Os resultados foram expressos em log ufc/g ou log ufc/ml no caso do caldo de cozedura do polvo.

3.8.1 Enumeração de microrganismos viáveis totais (TVC) a 30 °C

Sementeira por incorporação em meio plate count agar (CM0325 Oxoid Ltd., Hampshire, UK) e após arrefecimento as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 30 ± 2 °C, em aerobiose durante 3 dias (ISO 4833-1, 2013).

3.8.2 Enumeração de microrganismos viáveis totais (TVC) a 22 °C

Sementeira à superfície em meio plate count agar (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) e as placas foram incubadas à temperatura de 22 ± 2 °C, em aerobiose durante 3 - 5 dias, com base na metodologia descrita na norma ISO 4833-2 (ISO, 2013a).

3.8.3 Enumeração de *Pseudomonas* spp.

Sementeira à superfície em meio de cultura *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid CM0559, Oxoid Ltd., Hampshire, UK) suplementado com ceftriaxona, fusidina e cefaloridina, suplemento CFC (Oxoid SR0103 Oxoid Ltd., Hampshire, UK), recomendado para o isolamento da generalidade das espécies de *Pseudomonas* em produtos refrigerados. As placas foram incubadas em aerobiose a 22 ± 2 °C durante 3 - 5 dias (Lyhs, 2009).

3.8.4 Enumeração de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio (H₂S)

Sementeira por incorporação em meio Iron Agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona), placas incubadas em aerobiose a 22 ± 2 °C durante 3 - 5 dias, de acordo com o método descrito em Gram e Dalgaard (2002) e Lyhs (2009). As colónias negras foram contadas como microrganismos produtores de H₂S.

3.8.5 Enumeração de *Enterobacteriaceae*

Sementeira realizada por incorporação em camada dupla de meio Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA CM485 Oxoid Ltd., Hampshire, UK), seguida da incubação a 37 ± 2 °C durante 1 dia, com base no método descrito na norma ISO 21528 (ISO, 2004). A confirmação das colónias características foi realizada com recurso ao teste da oxidase e ao teste de fermentação (com incubação a 37 ± 2 °C durante 1 - 2 dias).

3.8.6 Enumeração de Coliformes e *E. coli*

Sementeira à superfície em agar cromogénico Chromocult® (10426 Merck, Alemanha), incubação a 37 ± 2 °C durante 1 dia, adaptado da norma ISO 9308-1 (ISO, 2014) e Gonzalez et al. (2003). O meio permite a deteção, diferenciação e enumeração de coliformes totais e *E. coli* em água e alimentos processados.

3.8.7 Enumeração de mesófilos aeróbios totais esporulados

Inativação das células vegetativas a 80 °C, durante 10-12 minutos, com base na metodologia descrita em Hugh et al. (2017), seguida de sementeira por incorporação em PCA (CM0325 Oxoid Ltd., Hampshire, UK) e incubação a 30 ± 2 °C, em aerobiose, durante 3 dias (ISO 4833-1, 2013).

3.9 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o software STATISTICA™ 7,0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Aplicou-se o teste t-Student para avaliar o efeito da cozedura industrial no perfil nutricional do polvo cozido. As alterações da qualidade durante a armazenagem dos diferentes produtos (polvo cozido, caldo de cozedura e filetes de robalo revestidos) foram avaliadas por aplicação da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla Tukey, para identificar diferenças significativas entre os vários grupos em comparação. Os testes foram aplicados ao nível de significância $\alpha=0,05$; pelo que se considerou existirem resultados significativamente diferentes sempre que o valor de p (p-value) foi inferior a 0,05 (Zar, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Polvo cozido e ultracongelado

O polvo tem um papel muito importante na gastronomia nacional e nos hábitos alimentares dos portugueses, podendo ser consumido cru em casos pontuais (por exemplo nas refeições de sushi e sashimi) mas, geralmente é sujeito a tratamentos culinários que envolvem a cozedura em água. Este processo destina-se a melhorar a digestibilidade, a textura, o aroma e sabor, bem como a palatabilidade e qualidade uma vez que, além de promover as características organolépticas, também inativa os microrganismos patogénicos, aumentando consequentemente a segurança deste alimento. Contudo, alguns consumidores descrevem alguma dificuldade em cozinhar o polvo em casa devido ao seu músculo ficar rígido, emborrachado e seco, comprometendo assim a sua aceitação. Assim, a disponibilização de um produto cozido ultracongelado com baixo teor em sódio, pronto a consumir ou a ser usado como ingrediente principal em diferentes receitas é da maior importância no contexto do que hoje se começa a designar como nova gastronomia baseada nos cefalópodes (new cephalopod gastronomy) (Mouritsen e Styrbæk, 2018).

4.1.1 Dados biométricos e rendimentos

Os polvos usados neste trabalho apresentavam elevado grau de frescura e tamanho uniforme 2077 ± 149 g (1780-2290 g). A massa média dos polvos depois de limpos era de 1805 ± 136 g) e a gama encontrava-se entre as 1548-1978 g. O rendimento na preparação (evisceração, lavagem e escorrimento) da parte edível do polvo, constituída por manto, braços e cabeça, foi de $86,5 \pm 2\%$, valor muito superior ao que se observa na preparação dos peixes em que o rendimento se situa em média entre 50-70% (Sikorski e Kolodziejska, 1986). Os cefalópodes constituem o grupo com maior percentagem de parte edível, sendo ainda comum que nas espécies de polvo os rendimentos sejam superiores aos de outros cefalópodes, como é o caso do choco e das lulas (Koueta et al., 2014).

O rendimento obtido na cozedura do polvo em condições industriais (relação entre o peso do polvo após e antes da cozedura) foi de 52,8%. Este rendimento aproxima-se do registado por outros autores em polvo cozido a vapor (Mendes et al., 2017) e em lulas jumbo (*Dosidicus gigas*) (Rosas-Romero et al., 2010). O baixo rendimento na cozedura pode resultar da elevada solubilização do tecido conjuntivo do músculo do polvo, bem como da desagregação e desidratação das fibras musculares (Kugino e Kugino, 1994; Rosas-Romero et al., 2010).

4.1.2 Efeito da cozedura industrial e ultracongelção do polvo na composição química e valor nutricional

Os procedimentos culinários que envolvem a aplicação de calor podem alterar o valor nutricional do pescado. Esta alteração pode ser mais ou menos intensa consoante a composição intrínseca, temperatura, tempo e método de confeção culinária.

4.1.2.1 Composição química aproximada

Os resultados obtidos para a composição química do polvo comum cru e cozido, valor energético e coeficientes de retenção encontram-se representados no quadro 4.1. Como é habitual nos produtos da pesca e aquicultura, também nos polvos usados neste estudo, a percentagem de humidade encontrava-se ao redor de 80%, valor este que se enquadra na gama anual encontrada por outros autores para a mesma espécie (Rosa, 2000; Gonçalves et al., 2017). Estudos anteriores com esta espécie (Rosa, 2000) revelam a não existência de variações sazonais significativas no teor em humidade no polvo desembarcado quer no norte (Viana do Castelo), centro (Cascais) e sul (Tavira) de Portugal. De igual modo, os resultados publicados por Gonçalves et al. (2017) não evidenciaram diferenças significativas para a humidade entre machos e fêmeas (indivíduos imaturos), nem entre inverno e verão quer para a humidade quer para os restantes constituintes maioritários. A maioria da água no pescado está retida nas proteínas miofibrilares enquanto uma pequena quantidade está fixada nas proteínas sarcoplasmáticas e no tecido conjuntivo.

O teor de humidade do polvo cru foi significativamente superior ao do polvo cozido, tendo-se verificado uma taxa de retenção (TR) de 47,8% (Quadro 4.1). Estes resultados encontram-se em consonância com o referido por vários autores que também verificaram a existência de uma diminuição do teor de humidade após o tratamento térmico de produtos da pesca e aquicultura, podendo esta diminuição variar entre 4 e 12% (Uran e Gokoglu, 2014; Bastias et al., 2017). Esta redução pode ser atribuída à desidratação das fibras musculares e, provavelmente, a alguma desnaturação proteica induzida pelo calor, em particular nas proteínas sarcoplasmáticas, que facilita a libertação da água (Kong et al., 2007; Costa et al., 2013; Bastias et al., 2017). Segundo Weber et al. (2008) e Ersoy et al. (2009) a evaporação da água pelo calor também contribui para a redução do seu teor no pescado cozinhado.

Quadro 4.1. Principais constituintes do polvo comum cru e cozido e respetivas taxas de retenção e valor energético.

Composição aproximada (g/100 g)	Cru¹	Cozido¹	TR (%)
Humidade	80,3 ± 1,0 ^b	72,8 ± 1,1 ^a	47,8
Cinza	1,72 ± 0,007	1,60 ± 0,04	49,2
Proteína	16,9 ± 1,1 ^a	25,2 ± 0,9 ^b	78,8
Gordura	0,43 ± 0,03 ^a	0,72 ± 0,03 ^b	89,5
Valor energético (kcal/100 g) ²	78,8 ± 4,9 ^a	112,9 ± 4,5 ^b	-

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). ²No cálculo do valor energético, os hidratos de carbono foram calculados por diferença.

O teor proteico médio no polvo cru foi de 16,9%, valor típico desta espécie (Rosa, 2000, Gonçalves et al., 2017). De acordo com Lee (1994), a maioria dos cefalópodes tem um teor proteico ao redor de 18% e a soma da percentagem da gordura e dos minerais não excede, em regra, 3%. As proteínas do pescado estão sujeitas a várias alterações durante a confeção culinária, envolvendo as próprias moléculas (essencialmente desnaturação e coagulação), ou resultantes de interações com outros constituintes (Kugino e Kugino, 1994; Sobral et al., 2018). Conforme se pode observar no Quadro 4.1, apesar da cozedura do polvo ter originado alguma solubilização e, conseqüentemente, alguma diminuição do teor proteico, a taxa de retenção das proteínas durante a cozedura foi bastante elevada (78,8%), observando-se um teor proteico no polvo cozido ao redor de 25%. Esta taxa de retenção está de acordo com as reportadas por Bognár (2002) para moluscos cozidos e com as verificadas para carpa (Gokoglu et al., 2004), biqueirão (Uran e Gokoglu, 2014) e salmão e cavala do Chile (Bastias et al., 2017). De acordo com Lin et al. (2009), a aplicação de qualquer tratamento térmico provoca um aumento do teor de proteína nos alimentos cozinhados, nomeadamente das miofibrilares, devido à eliminação de algumas proteínas sarcoplásmicas e do tecido conjuntivo.

A parte edível do polvo, tal como a da maioria dos cefalópodes, caracteriza-se por teores lipídicos baixos (0,5-1,0%), encontrando-se uma importante percentagem na pele e nas gónadas (Navarro e Villanueva, 2000). De acordo com O'Dor et al. (1984) a absorção dos lípidos a partir do alimento é baixa e, por outro lado, segundo Ballantyne et al. (1981) a sua metabolização é reduzida. Os fosfolípidos e os esteróis são, em regra, nos cefalópodes, as classes dominantes, sendo os triacilgliceróis constituintes menores (Nash et al., 1978; Hayashi e Yamamoto, 1987; Navarro e Villanueva, 2000). Neste estudo os teores em gordura não excederam 0,4%, verificando-se ligeiras diferenças em comparação com os resultados publicados por Gonçalves et al. (2017) que podem resultar da maior ou menor abundância de alimento disponível, temperatura da água e estado de maturação. A elevada taxa de retenção (89%) dos lípidos deve-se ao facto dos fosfolípidos se encontrarem sobretudo nas membranas celulares e, conseqüentemente, a sua libertação por ação do calor ser mais difícil do que, por exemplo, a dos triacilgliceróis.

No que respeita ao total dos minerais, verificou-se uma diminuição significativa do seu teor, tendo passado de 1,72% no polvo cru para 1,60% no cozido, a que correspondeu um fator de retenção de 49,2%. Esta diminuição indica uma apreciável solubilização deste constituintes e eliminação na água libertada durante a cozedura. Em regra, no pescado, a cozedura é o método no qual é registado uma maior redução do teor de cinza comparativamente a outros métodos (Uran e Gokoglu, 2014).

É de realçar que a cozedura da mesma espécie, também capturada na costa portuguesa (Bandarra et al., 2004) e de diferentes espécies de peixes em condições laboratoriais (Costa et al., 2013; Karimian-Khosroshahi et al., 2016), originou efeitos sobre a composição aproximada semelhantes aos verificados na cozedura em ambiente industrial.

Como consequência do aumento do teor de proteína e de gordura total no polvo cozido, o seu valor energético também aumentou em relação ao cru como se ilustra no quadro 4.1. O valor energético dos alimentos é um dos parâmetros a ter em consideração pelos consumidores que pretendem fazer escolhas alimentares saudáveis. Estes valores foram muito semelhantes aos obtidos em peixes magros, estando assim aconselhado o consumo de polvo cozido para integrar regimes alimentares hipocalóricos.

4.1.2.2 Perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos do polvo usado neste estudo (Quadro 4.2) é comparável com o referido para polvo capturado em diferentes zonas da costa atlântica portuguesa (Gonçalves et al., 2017) e polvo e outros cefalópodes provenientes do Mediterrâneo (Passi et al., 2002; Ben-Youssef et al., 2008). Este último autor verificou ainda que a profundidade não afeta o perfil dos ácidos gordos desta espécie de polvo. O grupo dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foi o maioritário no polvo cru com um total de 252 mg/100 g, que corresponde a cerca de 59% do total dos ácidos gordos, seguido pelo grupo dos saturados (SFA) (125,7 mg/100 g). Os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), com um total de 47,7 mg/100 g, constituíram o grupo minoritário (cerca de 11%). De entre os PUFA destacam-se o DHA e o EPA, cujo total corresponde a mais de 41% do total dos ácidos gordos. Do conjunto dos SFA, o palmítico (16:0) foi o mais relevante (72,9 mg/100 g), representando cerca de 58% do total deste grupo. Por seu lado, os isómeros com 18 e 20 carbonos foram os mais abundantes do grupo dos MUFA. Do conjunto dos ácidos gordos ómega 6 (n-6) o mais abundante foi o araquidónico (ARA) (20:4n-6), tal como também observado por Ben-Youssef et al. (2008) para esta espécie capturada no Mediterrâneo. O total dos ácidos gordos insaturados representou cerca de 70% do total. Os ácidos gordos mais abundantes, por ordem decrescente foram: docosahexaenóico > eicosapentaenóico > palmítico > esteárico > araquidónico. O perfil de ácidos gordos encontrado para o polvo comum é semelhante ao dos polvos *Amphioctopus neglectus* e *Cistopus indicus*, da lula *Uroteuthis duvauceli* e dos chocos *Sepia pharaonis* e *Sepiella inermis* capturados no Mar Árabe (Oceano Índico) (Chakraborty et al., 2016).

Quadro 4.2. Ácidos gordos mais abundantes no polvo comum cru e cozido e respetivas taxas de retenção.

Ácidos gordos (mg/100 g)		Cru ¹	Cozido ¹	TR (%)
Mirístico	14:0	3,40±0,92 ^a	5,85±1,08 ^b	90,9
Palmítico	16:0	72,91±5,08 ^a	128,77±8,16 ^b	93,2
Esteárico	18:0	35,26±5,81 ^a	55,18±4,90 ^b	82,6
Total saturados	ΣSFA	125,74±12,70 ^a	213,20±9,23 ^b	89,5
Palmitoleico	16:1n-7	2,10±0,64 ^a	5,60±0,68 ^b	141,0
Oleico	18:2n-9	9,58±2,24 ^a	17,50±3,33 ^b	96,4
11-eicosenóico	20:1n-9	14,99±2,13 ^a	24,00±1,23 ^b	84,5

Quadro 4.2.(cont.) Ácidos gordos mais abundantes no polvo comum cru e cozido e respetivas taxas de retenção.

Total monoinsaturados	ΣMUFA	47,68±4,83 ^a	83,24±0,98 ^b	92,1
Linoleico	18:2n-6	1,65±0,20 ^a	2,89±0,32 ^b	92,2
11-Eicosenóico	20:1n-9	14,99±2,13 ^a	24,00±1,23 ^b	84,5
Araquidónico	20:4n-6	29,00±3,78 ^a	51,20±3,36 ^b	93,2
Eicosapentaenóico (EPA)	20:5n-3	77,20±3,97 ^a	131,89±11,46 ^b	90,2
Docosapentaenóico	22:5n-3	6,97±0,92 ^a	11,53±0,63 ^b	87,3
Docosahexaenóico (DHA)	22:6n-3	100,43±4,96 ^a	169,50±5,07 ^b	89,1
Total polinsaturados	ΣPUFA	252,18±17,59 ^a	425,05±22,15 ^b	89,0
Soma EPA+DHA	EPA+DHA	177,63±8,40 ^a	301,39±15,74 ^b	89,5
Total ómega 3	ΣPUFA n-3	210,10±11,31 ^a	354,02±20,98 ^b	88,9
Total ómega 6	ΣPUFA n-6	40,34±5,79 ^a	68,63±4,17 ^b	89,8
Razão ómega 3/ómega 6	ΣPUFA n-3/ΣPUFA n-6	5,25±0,46	5,17±0,37	-----
Índice de trombogenicidade	IT	0,16±0,01	0,17±0,00	-----
Índice de aterogenicidade	IA	0,29±0,01	0,30±0,02	-----
Razão hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos	h/H	2,95±0,08	2,86±0,10	-----

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

No polvo cozido industrialmente verificou-se uma concentração significativa ($p < 0,05$) de todos os ácidos gordos e a manutenção do mesmo perfil (Quadro 4.2), isto é, os ácidos gordos mais abundantes foram os mesmos que no polvo cru. Os níveis de retenção foram cerca de 89, 90 e 92%, respetivamente para os PUFA, SFA e MUFA e no que respeita ao EPA e DHA as retenções foram cerca de 90%. Tal como no polvo cru também no cozido o total dos ácidos gordos insaturados representou cerca de 70% do total. O C16:0 (ácido palmítico) e o C20:1n-9 (ácido 11-eicosenóico) que representaram, respetivamente, cerca de 59% e 30% do total dos SFA e de MUFA, foram os que mais se destacaram de cada grupo. A taxa de retenção após cozedura para todos os ácidos gordos foi bastante elevada, variando entre 82,6 (C18:0) e 141,0% (C16:1n-7). Estas retenções indicam que os ácidos gordos deste cefalópode foram pouco afetados pela temperatura usada. Comportamento semelhante foi observado para algumas espécies de peixe por Rosa et al. (2007); Weber et al. (2008) e Badiani et al. (2013). No entanto, Sobral et al. (2018) referem que o teor e perfil dos ácidos gordos pode ser modificado em várias espécies de pescado pela utilização de tratamentos térmicos a

temperaturas muito elevadas devido a reações de oxidação, isomerização *cis-trans* e hidrogenação, facto que não deve ter ocorrido neste caso, pois a temperatura interna não atingiu 100 °C.

A cozedura do polvo em condições industriais não afetou nem os índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) nem a razão entre os ácidos gordos hipocolesterolémicos e hipercolesterolémicos (razão h/H). Os índices nutricionais IA e IT obtidos foram inferiores aos relatados por Chakraborty et al. (2016) para polvo cru de outras espécies e, por Costa et al. (2013) para corvina-legítima crua e cozida. Os baixos valores de IA e IT sugerem um elevado efeito cardioprotetor, uma vez que estes índices representam o equilíbrio entre o efeito dos diferentes ácidos gordos na promoção ou na prevenção de doenças coronárias (Ulbricht e Southgate, 1991). Os valores de h/H observados encontraram-se dentro dos limites mencionados por Chakraborty et al. (2016) para outros cefalópodes crus, e reforçam a importância nutricional que o consumo de polvo comum pode ter na saúde humana (Fernandes et al., 2014).

4.1.2.3 *Perfil de aminoácidos*

A composição em aminoácidos no polvo comum cru e cozido industrialmente encontra-se indicada no quadro 4.3. Estes resultados permitem concluir que as proteínas desta espécie contêm proporções bem balanceadas de aminoácidos essenciais e não essenciais. Embora estes valores estejam em consonância com os publicados por outros autores para diferentes espécies de cefalópodes (Villanueva et al., 2004; Rosa et al., 2005; 2006), o teor em aminoácidos nestes pode ser também afetado por diferenças geográficas, idade e condição fisiológica (Capillas et al., 2002).

Tal como descrito para a maioria das espécies de pescado (Rosa et al., 2007), também no polvo comum usado neste trabalho os ácidos glutâmico e aspártico foram os aminoácidos que se encontraram presentes em quantidades mais elevadas (Quadro 4.3), representando cerca de 40% do total. Pelo contrário, a cistina+cisteína foram os aminoácidos que se encontravam em menor quantidade tanto no polvo cru como no cozido. Entre os aminoácidos essenciais (AAE) a leucina foi o mais abundante, seguindo-se a lisina, representando estes dois aminoácidos em conjunto aproximadamente 40% do total de AAE. De modo oposto, o triptofano foi o AAE que se encontrou em quantidade mais reduzida, representando apenas cerca de 3% do total de AAE. Resultados idênticos foram reportados por Bandarra et al. (2004). No seu conjunto os AAE representaram cerca de 31,3% e 35,5% do total de aminoácidos do polvo cru e cozido, respetivamente. Estas percentagens são inferiores às relatadas por Chakraborty et al. (2016). No entanto, estes autores não determinaram o teor de taurina, um aminoácido que é bastante relevante no polvo cru e cozinhado (Quadro 4.3). O elevado teor em taurina contribui para o interesse da inclusão do polvo numa dieta equilibrada, uma vez que este aminoácido tem efeitos fisiológicos em diferentes órgãos e sistemas, como, por exemplo, os sistemas nervoso e cardiovascular (Chen et al., 2019).

Quadro 4.3. Aminoácidos mais abundantes (mg/100 g) no polvo comum cru e cozido e respectivas taxas de retenção.

Aminoácidos	Cru ¹	Cozido ¹	TR (%)
Essenciais (AAE)²			
Histidina	275,5±15,1 ^a	441,2±41,8 ^b	84,5
Isoleucina	479,3±25,4 ^a	897,3±115,8 ^b	98,8
Leucina	940,1±60,9 ^a	1613,4±126,9 ^b	90,6
Lisina	660,5±5,7 ^a	1238,1±100,3 ^b	98,9
Metionina	347,8±18,6 ^a	568,5±42,9 ^b	86,3
Fenilalanina	544,8±38,8 ^a	861,1±72,1 ^b	83,4
Treonina	495,4±26,0 ^a	789,3±41,5 ^b	85,0
Triptofano	127,1±8,6 ^a	179,7±9,7 ^b	74,6
Valina	454,7±25,2 ^a	828,2±96,6 ^b	96,1
ΣAAE	4104,9±584,3 ^a	7425,8±632,9 ^b	
Não essenciais (AANE)²			
Alanina	729,6±53,7 ^a	1116,7±81,0 ^b	80,8
Arginina*	1049,6±26,3 ^a	1594,3±154,9 ^b	80,2
Ácido aspártico	1325,0±66,5 ^a	2239,7±136,6 ^b	89,2
Cistina+Cisteína*	72,8±11,6 ^a	111,0±5,3 ^b	79,7
Ácido glutâmico	1971,5±84,7 ^a	3257,1±206,3 ^b	87,2
Glicina*	1179,5±302,1	1467,6±163,5	65,7
Prolina*	698,7±114,9 ^a	957,8±54,8 ^b	72,3
Serina	615,6±13,5 ^a	904,4±41,3 ^b	77,5
Taurina*	1225,0±142,9	1007,6±124,8	43,4
Tirosina*	539,5±40,3 ^a	841,7±70,2 ^b	82,3
ΣAANE	9407,0±371,6 ^a	13496,9±973,8 ^b	
ΣAA	13511,9±714,6 ^a	20922,7±1606,7 ^b	
ΣAAE /ΣAA (%)	30,3±3,2 ^a	35,5±0,3 ^b	

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). ²Classificação de acordo com WHO (2007). *Aminoácidos condicionalmente essenciais (aminoácidos que podem tornar-se essenciais em condições fisiológicas específicas ou em casos de doença), (WHO, 2007).

De um modo geral, verificou-se uma elevada taxa de retenção de aminoácidos após cozedura, com valores que variaram entre 98,9% para a lisina e 43,3% para a taurina. A mais baixa taxa de retenção de taurina já era esperada visto tratar-se de um aminoácido não proteico. As taxas de retenção de aminoácidos observadas estão de acordo com as elevadas taxas descritas para proteínas que sofrem, principalmente, alterações físicas em vez de perdas durante a cozedura

(Kugino e Kugino, 1994; Sobral et al., 2018). As taxas de retenção dos aminoácidos essenciais variaram entre os 74,6% para o triptofano e os 98,9% para a lisina. Estas elevadas taxas de retenção significam que a composição equilibrada de aminoácidos é mantida após a cozedura em condições industriais. Bógnar (2002) também mencionou uma elevada taxa de retenção de metionina e lisina (95%, valores estimados) para pratos à base de moluscos cozidos.

4.1.2.4 Elementos minerais (*macroelementos, microelementos e elementos tóxicos*)

A concentração de alguns macroelementos, microelementos e elementos tóxicos no polvo cru e cozido bem como as respetivas taxas de retenção podem observar-se no quadro 4.4. Tanto no polvo cru como no polvo cozido, o sódio foi o macroelemento que apresentou um teor mais elevado (393 mg/100 g), seguido pelo potássio, fósforo e, finalmente, pelo magnésio. Estes teores encontram-se dentro das gamas reportadas por Lourenço et al. (2009) e Rjeibi et al. (2014). Relativamente aos microelementos, o Zn foi o dominante seguido pelo Cu. Padrões idênticos foram descritos para a mesma espécie por Bandarra et al. (2004) e Lourenço et al. (2009) e para o choco por Thanonkaew et al. (2006). No que respeita ao selénio, Lourenço et al. (2009) reportaram para a mesma espécie um teor mais baixo (0,1 mg/kg) que o encontrado no presente estudo (0,4 mg/kg). Contudo, valores semelhantes para este elemento foram descritos por Costa et al. (2013) para corvina-legítima crua e cozinhada (0,3 mg/kg). Por seu lado, o teor em iodo foi de 0,08 mg/kg em cru e 0.12 mg/kg em cozido. Os cefalópodes são conhecidos como predadores muito ativos e carnívoros pelo que naturalmente a maior parte dos elementos minerais pode ser veiculada pela dieta, embora possa também ocorrer a absorção osmótica de alguns destes minerais da água do mar através das brânquias e da superfície do corpo, uma vez que eles vivem em ambiente hipo-osmótico (Chakraborty e Joseph, 2015). Por outro lado, alguns minerais podem ser também absorvidos pela glândula digestiva quando grandes quantidades de água do mar são ingeridas durante e após a alimentação (Wells and Wells, 1989).

Apenas os teores de fósforo, zinco e iodo variaram significativamente antes e após cozedura do polvo, sendo mais elevados no polvo cozido do que no polvo cru. Um resultado oposto (menor conteúdo nos produtos cozidos) foi reportado para os teores de zinco e fósforo em algumas espécies de peixes (Gokoglu et al., 2004; Hosseini et al., 2014). Em relação ao iodo, Erkan et al. (2011) relataram que, dependendo da espécie, o seu teor tanto podia aumentar como diminuir após cozedura a vapor.

A taxa de retenção variou entre 44,6% (Na) e 66,8% (P) e entre 53,5% (Se) e 86,8% (I) para macro e microelementos, respetivamente (Quadro 4.4). Outros autores obtiveram taxas de retenção dos mesmos macroelementos e do zinco e cobre mais elevadas ($\geq 75\%$) em moluscos e em peixes cozidos (Bógnar, 2002; Rosa et al., 2007). No entanto, os valores referidos por Bógnar (2002) são valores de retenção estimados. As baixas taxas de retenção observadas podem ser atribuídas à lixiviação de minerais para a água, conforme sugerido por Murphy et al. (1975).

Os elementos tóxicos - mercúrio, cádmio e chumbo - apresentaram teores muito inferiores aos limites estabelecidos pela União Europeia (1,0; 0,3 e 0,5 mg/kg, respetivamente) (Regulamento (CE) 1881/2006; Regulamento (CE) 2015/1005) (Quadro 4.4). Desta forma, a elevada taxa de retenção do mercúrio (95,7) não constitui um motivo de preocupação. Os baixos teores de minerais tóxicos obtidos estão de acordo com os verificados por Lourenço et al. (2009) e Raimundo et al. (2010) para a mesma espécie e indicam que o *O. vulgaris* da costa portuguesa não representa um problema de saúde pública, no que diz respeito a estes contaminantes. Para outras espécies de polvo -*O. Salutii* (0.08–1.45 mg/kg), *Eledone cirrhosa* (0.03–0.40 mg/kg) e *Eledone moschata* (0.01–0.73 mg/kg), Storelli et al. (2005) encontraram valores muito superiores de cádmio no manto em cru.

Quadro 4.4. Concentração de macroatmentos, microelementos e elementos tóxicos no polvo comum e respetivas taxas de retenção.

Elementos	Cru ¹	Cozido ¹	TR (%)
Macro (mg/100g)			
Mg	57,4 ± 2,5	56,1 ± 2,4	51,6
P	162,2 ± 6,5 ^a	205,2 ± 13,3 ^b	66,8
K	262,2 ± 24,1	241,7 ± 27,9	48,6
Na	393,3 ± 41,6	332,5 ± 24,3	44,6
Micro (mg/kg)			
I	0,08 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^b	86,8
Se	0,35 ± 0,06	0,35 ± 0,01	53,5
Cu	1,8 ± 0,4	2,7 ± 0,6	80,5
Zn	12,6 ± 0,6 ^a	16,6 ± 0,8 ^b	69,8
Tóxicos (mg/kg)			
Hg	0,04 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,02 ^b	95,7
Cd	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,00	42,5
Pb	<0,06*	0,10 ± 0,03	-----

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). *Limite de quantificação

4.1.2.5 Contribuição nutricional

4.1.2.5.1 Proteínas

As proteínas dos alimentos são consideradas de elevada qualidade quando apresentam elevada digestibilidade e incluem teores de AAE suficientemente elevados para satisfazer os requerimentos nutricionais humanos (WHO, 2007). Os resultados obtidos indicam que o polvo comum apresenta proteínas de elevada qualidade nutricional, não sendo essa qualidade afetada pela cozedura industrial, como se pode confirmar através da observação dos elevados

valores de score de cada aminoácido determinados em relação ao padrão FAO (FAO, 2013) (Quadro 4.5). Com efeito, apenas a valina apresentou um score inferior a 100%, mas mesmo assim bastante elevado (84,3%). Importa igualmente salientar que de acordo com os Regulamentos CE n.º 1924/2006 (CE, 2006b) e CE n.º 1169/2011 (EU, 2011), o polvo cozido pode ser classificado como um produto alimentar rico em proteínas, pois mais de 20% do valor energético é fornecido por proteínas.

Quadro 4.5. Concentração e score de aminoácidos essenciais do polvo cozido.

Aminoácidos	Concentração (mg/g de proteína)		Score de Aminoácidos (%) ¹
	Padrão FAO*	Polvo Cozido ¹	
Histidina	15	17,5 ± 1,9	116,8 ± 12,4
Isoleucina	30	35,6 ± 4,6	118,7 ± 15,2
Leucina	59	64,1 ± 5,7	108,6 ± 9,6
Lisina	45	49,2 ± 4,1	109,2 ± 9,1
Metionina + Cisteína	22	27,0 ± 2,3	122,5 ± 10,6
Fenilalanina + Tirosina	38	67,7 ± 6,6	178,0 ± 17,4
Treonina	23	31,7 ± 2,2	137,9 ± 9,6
Triptofano	6	7,1 ± 0,6	119,0 ± 9,2
Valina	39	32,9 ± 3,8	84,3 ± 9,8

*Padrão FAO (FAO, 2013), ¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão.

4.1.2.5.2 Minerais e ácidos gordos (EPA e DHA)

O consumo de 150 g de polvo comum cozido (porção usual incluída numa refeição de um adulto) contribui, em termos de macromelementos, para 10,4% (potássio), 24,9% (sódio) e 56,0% (fósforo) da dose diária adequada para adultos (Quadro 4.6). No que respeita ao sódio, importa realçar que o seu teor intrínseco corresponde a um valor muito inferior ao limite recomendado pela EFSA para a ingestão diária de sal (± 5 g de sal) (EFSA, 2019), conferindo, no entanto, um sabor salgado adequado (avaliado pelo painel sensorial) que torna desnecessária a adição de sal durante a confeção. Este aspeto é particularmente relevante, pois o consumo excessivo de sal contribui para o aumento da pressão sanguínea e risco de desenvolvimento de doença cardíaca e de acidente vascular cerebral. Estima-se que a redução de sódio possa prevenir a ocorrência de 2,5 milhões de mortes por ano a nível mundial (EFSA, 2019; WHO, 2016).

Em termos de microelementos, a contribuição nutricional variou de 25,5 a 33,2% para o cobre e zinco, e de 12,4% a 75,6% para o iodo e selénio, respetivamente. Assim, o polvo comum cozido em condições industriais representa uma importante fonte alimentar de selénio, elemento que é essencial para combater algumas doenças causadas pelo *stress* oxidativo (Chakraborty et al., 2016). Apesar de fornecer apenas 12,4% da dose diária recomendada de

iodo, o consumo de 150 g de polvo cozido pode contribuir para reduzir deficiências cognitivas e mentais, facto da maior importância, pois sabe-se que quase um terço da população global tem uma ingestão inadequada deste microelemento (EFSA, 2014c).

O consumo de uma porção de 150 g de polvo cozido constitui igualmente uma boa fonte de EPA e DHA, permitindo suprir a dose diária destes dois ácidos gordos recomendada pela EFSA (2015d), dose essa que foi estabelecida tendo por base considerações da saúde cardiovascular. Portanto, o polvo comum cozido deve ser consumido por indivíduos com doenças cardiovasculares e pode ser considerado um produto alimentar nutritivo.

Importa também realçar que o ácido gordo saturado mirístico, que é o que tem maior efeito colesterolémico (cerca de quatro vezes o do palmítico) (Higgs, 2000) é o menos abundante do conjunto dos saturados. O ácido gordo saturado esteárico é considerado neutro em termos de efeito colesterolémico (Higgs, 2000).

Quadro 4.6. Contribuição nutricional do polvo cozido (%) em termos de elementos minerais e EPA+DHA, tendo como referência o consumo de uma porção de 150 g.

Elementos e ácidos gordos	Adultos	DDR ¹ (mg/dia)	Contribuição nutricional ² (%)
Macroelementos			
Mg	Homem	350 ³	24,0 ± 1,0
	Mulher	300 ³	28,0 ± 1,2
P	Homem/Mulher	550 ⁴	56,0 ± 3,6
K	Homem/Mulher	3500 ⁵	10,4 ± 1,2
Na	Homem/Mulher	2000 ⁶	24,9 ± 1,8
Microelementos			
Cu	Homem	1,6 ⁷	25,5 ± 5,3
	Mulher	1,3 ⁷	31,3 ± 6,5
Zn	Homem	9,4 ⁸	26,5 ± 1,4
	Mulher	7,5 ⁸	33,2 ± 1,7
Se	Homem/Mulher	0,07 ⁹	75,6 ± 2,9
I	Homem/Mulher	0,15 ¹⁰	12,4 ± 1,1
Ácidos gordos ómega 3			
EPA+DHA	Homem/Mulher	250 ¹¹	180,8 ± 9,4

¹Dose diária recomendada, de referência para adultos; ²Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão (n=3); ³EFSA, 2015a; ⁴EFSA,2015b; ⁵EFSA, 2016; ⁶EFSA, 2019; ⁷EFSA, 2015c; ⁸considerando um nível de ingestão de fitato de 300 mg/dia (EFSA, 2014a); ⁹EFSA, 2014b; ¹⁰EFSA, 2014c; ¹¹Dose recomendada considerando a saúde vascular (EFSA, 2015d).

4.1.2.6 Preparação e avaliação sensorial de dois pratos tradicionais à base de polvo cozido

Com o polvo cozido congelado foram preparados dois pratos, arroz de polvo e polvo no forno, tradicionalmente designado como polvo à lagareiro, usando receitas tradicionais portuguesas

Para tal descongelou-se em câmara de refrigeração a 4 °C uma embalagem de polvo cozido (cerca de 400 g) e uma de caldo de cozedura (200 ml) para confeccionar cada um dos pratos.

Para o arroz de polvo foi preparado ligeiro refogado de cebola e alho em azeite (50 ml de azeite, 1 cebola média, 2 dentes de alho) ao qual se adicionou o caldo de cozedura, arroz carolino (100 g) e a quantidade necessária de água. Deixou-se cozer o arroz e próximo do final juntaram-se os pedaços de manto e de braços de polvo. Por último adicionou-se salsa e coentros a gosto. O arroz foi servido de imediato ao painel sensorial.

Para o polvo no forno usou-se apenas o polvo cozido ao qual adicionou por cima uma quantidade adequada de azeite (cerca de 20 ml) e colocou-se diretamente, em embalagem de alumínio, no forno (calor seco, 100 °C) durante 10-15 minutos apenas para criar camada crocante. O polvo no forno foi servido de imediato ao painel sensorial.

Os resultados da avaliação sensorial dos dois pratos (Fig. 4.1) de polvo no forno (à lagareiro na designação tradicional) e arroz de polvo preparados com o polvo cozido em condições indústrias encontram-se na figura 4.2.

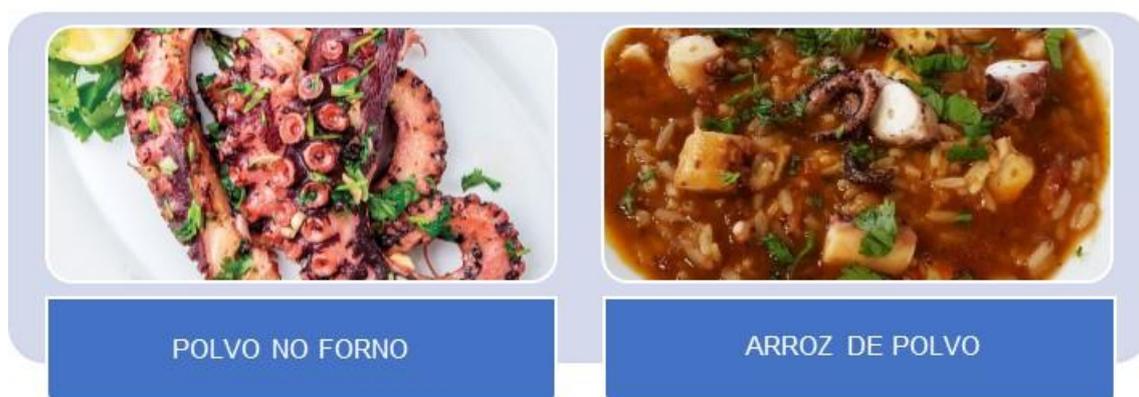


Figura 4.1. Aspeto dos dois pratos tradicionais

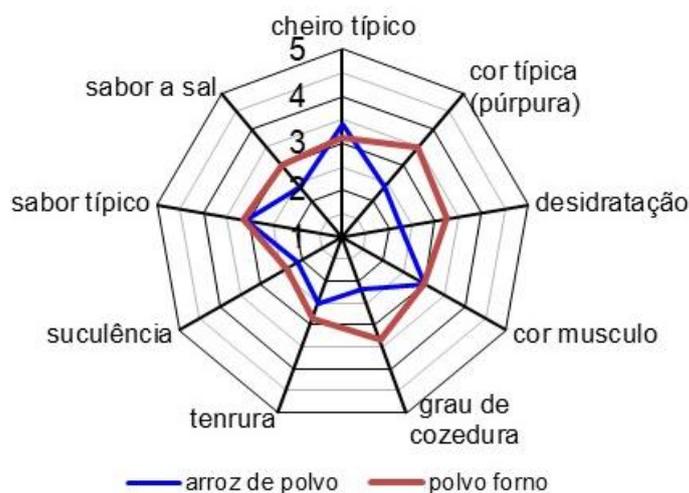


Figura 4.2. Perfil sensorial dos pratos de arroz de polvo e polvo no forno. Os resultados correspondem a valores médios ($0,0 \leq DP \leq 1,8$), usando uma escala de intensidade de atributos/descriptores de cinco pontos.

A avaliação feita com base nos atributos: – cheiro típico, cor típica (púrpura), desidratação, cor do músculo, grau de cozedura, tenrura, suculência, sabor típico e sabor a sal – indicou que ambos os pratos estavam equilibrados e muito satisfatórios, embora os provadores tenham detetado algumas diferenças entre eles. A cor típica do polvo era mais intensa no polvo cozinhado no forno (valor médio \pm desvio padrão, $3,5 \pm 1,7$) do que no arroz ($2,4 \pm 0,5$) que pode ser devido a uma maior desidratação exterior do polvo, devido ao calor seco que foi aplicado que fez concentrar e/ou escurecer os pigmentos da pele, e no caso do arroz de polvo ter havido alguma descoloração devido ao próprio processo e aos ingredientes usados. O cheiro típico foi mais forte no arroz de polvo ($3,4 \pm 0,5$) do que no polvo cozinhado no forno ($3,1 \pm 1,0$) provavelmente devido à adição do caldo de cozedura. O grau de cozedura e a tenrura foram considerados mais equilibrados no polvo no forno, respetivamente $3,3 \pm 1,5$ e $2,9 \pm 0,6$, do que no arroz de polvo ($2,2 \pm 0,4$ e $2,5 \pm 0,4$, respetivamente), provavelmente devido ao facto do polvo ter sido adicionado ao arroz na fase final da preparação, isto é o seu tempo de cozedura no arroz ter sido inferior ao da confeção do polvo no forno. Quanto à suculência, respetivamente $2,1 \pm 0,2$ e $2,4 \pm 0,5$ no arroz de polvo e no polvo no forno, considera-se que o valor mais elevado pode resultar do facto de polvo no forno ter os braços inteiros o que favorece uma certa retenção da humidade interna enquanto no arroz os braços estavam cortados em pedaços. O sabor típico foi idêntico em ambos os pratos ($3,1 \pm 0,6$ e $3,1 \pm 0,6$, respetivamente no arroz e no polvo no forno) e, por último, o sabor a sal ($2,4 \pm 0,5$ e $3,0 \pm 0,00$ (respetivamente no arroz e no polvo no forno) foi ligeiramente superior no polvo no forno, provavelmente porque no arroz de polvo havia mais ingredientes, resultando daí uma menor perceção deste sabor.

4.1.3 Efeito da armazenagem em congelado do polvo cozido e caldo de cozedura no valor nutricional e na qualidade

Ao longo da armazenagem em congelado do polvo cozido e caldo de cozedura em câmara de armazenagem de congelados foi feita a monitorização contínua da temperatura e da humidade relativa do ar, tendo sido efetuadas 5383 leituras. Os valores médios obtidos foram, respetivamente $16,18 \pm 0,60$ °C e $83,11 \pm 3,35$ %.

4.1.3.1 *Composição química e valor energético do polvo congelado*

Os resultados obtidos para a evolução da composição química do polvo cozido ultracongelado e valor energético durante a armazenagem em congelado revelaram diferenças significativas com exceção do teor em cinza (Quadro 4.7). A significativa redução do teor em água ao longo da armazenagem em congelado pode estar relacionada com alguma desnaturação proteica, desidratação e perdas de exsudado durante a descongelação. De acordo com Fukuda (2006) e Fukuda et al. (2011), a redução do teor em água pode ser elevada sobretudo quando ocorre uma importante desnaturação das proteínas miofibrilares do pescado que leva a uma diminuição da capacidade de ligação da água e, conseqüentemente, impede a sua reabsorção durante o processo de descongelação. A diminuição do teor em proteína, sobretudo após o quarto mês de armazenagem em congelado, pode resultar provavelmente de alguma desnaturação, conforme observado por Raman e Mathew (2015) em lula indiana armazenada em congelado. Estudos realizados em carne congelada sugerem que as pequenas perdas por solubilização da proteína no exsudado durante a descongelação podem também contribuir para esta redução (Akhtar et al., 2013). Todavia, nem sempre a diminuição do teor de proteína pode ser atribuída a uma solubilização tal como referido por Ablikim, et al. (2016) com base em estudos sobre a influência do tempo de armazenagem em carne de borrego congelada nas concentrações de compostos solúveis em água e no teor de matéria seca. No que respeita à gordura, verificou-se uma concentração significativa no oitavo mês, devida à redução da humidade. Por seu lado os teores de cinza não foram afetados. As diferenças no valor energético decorrem das alterações nos principais constituintes.

Quadro 4.7. Evolução dos teores dos principais constituintes e valor energético do polvo comum cozido e armazenado em congelado.

Composição química aproximada (g/100 g) ¹	Armazenagem em congelado* (meses)		
	1	4	8
Humidade	$72,5 \pm 1,2^{a,b}$	$73,6 \pm 0,2^b$	$71,6 \pm 0,9^a$
Proteína	$25,5 \pm 0,9^b$	$24,5 \pm 0,4^{a,b}$	$23,4 \pm 0,9^a$
Gordura	$0,70 \pm 0,00^a$	$0,71 \pm 0,05^a$	$0,79 \pm 0,04^b$
Cinza	$1,60 \pm 0,05$	$1,58 \pm 0,01$	$1,65 \pm 0,04$
Valor energético (kcal/100 g) ¹	$120,5 \pm 3,6^b$	$116,5 \pm 1,8^{a,b}$	$112,5 \pm 3,9^a$

¹Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). *T= $16,18 \pm 0,60$ °C e HR= $83,11 \pm 3,35$ %.

Considera-se que para as reduzidas alterações verificadas na composição química aproximada deve ter contribuído o facto de o produto ter sido previamente congelado para amaciamento do músculo e cozido antes da congelação rápida e armazenagem em congelado (*T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %), assim como as condições de armazenagem usadas terem sido adequadas, contrariamente ao que se verifica noutros produtos que não foram cozinhados nem sujeitos a uma congelação prévia à cozedura.

4.1.3.2 Perfil de ácidos gordos do polvo congelado

A evolução do perfil de ácidos gordos bem como dos diferentes índices ao longo da armazenagem em congelado encontra-se sumarizada no quadro 4.8. Observou-se um aumento significativo dos 3 ácidos gordos saturados mais relevantes a partir do quarto mês que se refletiu no aumento do teor total dos SFA (cerca de 208,0 mg/100 g ao fim do primeiro mês de armazenagem, 213,8 no mês 4 e 248,0 no mês 8). No que respeita ao conjunto dos MUFA não se observaram diferenças significativas, com exceção do ácido gordo palmitoleico que aumentou significativamente nos últimos quatro meses de armazenagem em congelado. Quanto aos teores de PUFA, verificaram-se aumentos significativos dos teores do ácido gordo linoleico e do EPA a partir do quarto mês que, todavia, não influenciaram significativamente o total, respetivamente 412,3 mg/100 g (mês 1), 419,1 mg/100 g (mês 4) e 453, 2 mg/100 g (mês 8). Gullian-Klanian et al. (2017) verificaram aumentos significativos (2,52%) dos SFA ao fim do terceiro mês de armazenagem em congelado no polvo vermelho (*Octopus maya*), diminuições ligeiras dos MUFA (1,31% e 1,92% respetivamente ao fim do terceiro e quinto mês de armazenagem em congelado) e diminuições significativas do total de PUFA (6,07% e 9,28%, respetivamente ao fim do terceiro e quinto mês de armazenagem em congelado). Atayeter e Ercoşkun (2011) observaram que os SFA aumentaram e os somatórios de MUFA e PUFA diminuíram quer no manto quer nos tentáculos durante a armazenagem em congelado na lula europeia (*Loligo vulgaris*).

O perfil de abundância dos três grupos de ácidos gordos no polvo comum não se alterou nem com a cozedura nem com a armazenagem em congelado, pois verificou-se sempre a mesma hierarquia PUFA>SFA>MUFA. Relativamente ao índice PUFA n-3/PUFA n-6, verificou-se um aumento significativo após quatro meses de congelação, tendo evoluído desde cerca de 5,09 (mês 1), 5,72 (mês 4) até 6,52 (mês 8). Por seu lado, a soma das concentrações de EPA+DHA exibiu um aumento no segundo período da armazenagem em congelado (após o quarto mês) que evoluiu entre 302,1 e 331,3 mg/100 g. Este valor pode considerar-se um valor médio, pois segundo Chen e Liu (2020) os teores médios oscilam no marisco (incluindo moluscos) entre 63,6 e 522,7 e nos peixes entre 96,0 e 1370,7 mg/100 g.

Os índices TI e AI registaram um ligeiro aumento, sobretudo a partir do quarto mês de armazenagem em congelado. Apesar de não existirem valores recomendados para estes

índices, considera-se que valores mais baixos exprimem uma relação mais favorável para a saúde pelo que quanto mais baixos forem melhor será a qualidade nutricional dos ácidos gordos (Ulbricht e Southgate, 1991). Todavia, os aumentos registados (embora os valores sejam muito baixo) para TI e AI não justificam que se considere o polvo cozido congelado como um alimento com potencial para promover o aparecimento de doenças coronárias tanto mais que os valores encontrados foram muito baixos comparados com a gama de valores usuais em produtos da pesca, respetivamente 0,14–0,87 e 0,21- 1,41 (Chen e Liu, 2020). O índice h/H diminuiu significativamente nos últimos quatro meses de armazenagem e evoluiu entre 2,80 e 2,53, valores que se incluem na gama indicada por Chen e Liu (2020) quer para marisco (1.73 - 4.75) quer para peixe (1.54 to 4.83). Os valores do índice PI que transmitem informação sobre a degradação dos PUFA registaram uma diminuição, contrariamente ao esperado, apenas significativa entre o quarto e o oitavo mês de armazenagem, respetivamente 2,33 e 2,13.

Importa ter em conta que algumas alterações dos teores de ácidos gordos (ligeiros aumentos) podem refletir também a concentração do teor lipídico entre o quarto e o oitavo mês (Quadro 4.8) devido a uma ligeira desidratação do produto e não apenas às alterações induzidas pela armazenagem em congelado.

Quadro 4.8. Evolução dos teores dos principais ácidos gordos e principais índices associados do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Ácidos gordos (mg/100 g) ¹		Armazenagem em congelado* (meses)		
		1	4	8
Mirístico	14:0	5,47 ± 0,98 ^a	6,08 ± 0,63 ^a	7,71 ± 0,32 ^b
Palmítico	16:0	124,90 ± 5,37 ^a	129,47 ± 8,28 ^a	155,26 ± 1,65 ^b
Esteárico	18:0	52,98 ± 3,58 ^a	56,50 ± 3,56 ^{ab}	61,44 ± 4,67 ^b
Total saturados	ΣSFA	207,98 ± 2,17 ^a	213,81 ± 11,59 ^a	248,01 ± 11,67 ^b
Palmitoleico	16:1n-7	5,90 ± 0,51 ^a	4,71 ± 0,35 ^a	7,59 ± 1,01 ^b
Vacénico	18:1n-7	14,67 ± 0,45	12,68 ± 0,32	15,30 ± 3,13
Oleico	18:1n-9	15,59 ± 0,36	18,00 ± 3,85	19,93 ± 1,92
11-eicosenóico	20:1n-9	24,63 ± 1,24	23,42 ± 0,80	25,42 ± 3,85
Total monoinsaturados	ΣMUFA	82,94 ± 1,69	79,59 ± 4,98	90,71 ± 14,69
Linoleico	18:2n-6	2,70 ± 0,05 ^a	2,81 ± 0,59 ^a	3,83 ± 0,29 ^b
Araquidónico	20:4n-6	51,37 ± 3,86	45,63 ± 6,04	44,29 ± 7,16
Eicosapentaenóico (EPA)	20:5n-3	125,47 ± 3,22 ^a	130,70 ± 16,21 ^a	155,79 ± 2,22 ^b
Docosapentaenóico	22:5n-3	11,38 ± 0,67	11,45 ± 0,45	13,25 ± 1,62
Docosahexaenóico (DHA)	22:6n-3	167,73 ± 4,73	171,41 ± 2,04	175,47 ± 9,66
Total polinsaturados	Σ PUFA	412,27 ± 1,76	419,12 ± 36,42	453,22 ± 16,44
Soma EPA+DHA	EPA + DHA	293,20 ± 7,90 ^a	302,11 ± 18,14 ^a	331,26 ± 9,77 ^b
Total ómega 3	Σ PUFA n-3	342,19 ± 5,29 ^a	354,59 ± 26,73 ^a	391,05 ± 9,12 ^b

Quadro 4.8. (cont.) Evolução dos teores dos principais ácidos gordos e principais índices associados do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Total ómega 6	Σ PUFA n-6	67,51 ± 4,28	62,60 ± 9,54	60,77 ± 8,72
Razão ómega 3/ómega 6	PUFA n-3/PUFA n-6	5,09 ± 0,40 ^a	5,72 ± 0,45 ^{ab}	6,52 ± 0,81 ^b
Índice de trombogenicidade	TI	0,17 ± 0,00 ^a	0,17 ± 0,00 ^a	0,18 ± 0,00 ^b
Índice de aterogenicidade	AI	0,30 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,00 ^a	0,34 ± 0,02 ^b
Razão entre ácidos gordos hipocolesterolémicos e hipercolesterolémicos	h/H	2,87 ± 0,12 ^b	2,80 ± 0,04 ^b	2,53 ± 0,10 ^a
Índice de polienos	PI	2,35 ± 0,04 ^b	2,33 ± 0,02 ^b	2,13 ± 0,04 ^a

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). *T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %.

4.1.3.3 Perfil de aminoácidos do polvo congelado

O quadro 4.9 ilustra a evolução dos teores de aminoácidos essenciais e não essenciais no polvo cozido armazenado em congelado. De um modo geral as alterações foram mínimas. Assim, os ácidos glutâmico e aspártico continuaram a ser os mais abundantes e a cistina+cisteína foram os que se encontraram em menores quantidades. Entre os AAE a leucina e a lisina continuaram a ser os mais relevantes, representando em conjunto cerca de 40% do total de AAE. O triptofano foi o AAE presente em quantidade mais reduzida. No seu conjunto os AAE representaram cerca de 34,5% do total de aminoácidos. Estes resultados sugerem que a armazenagem em congelado nas condições usadas não afetou praticamente o perfil dos aminoácidos essenciais e não essenciais. Wesselinova (2000) encontrou um comportamento semelhante para dez espécies de peixe capturadas no Atlântico Norte e no Atlântico Sul armazenadas em congelado até 12 meses.

Quadro 4.9. Evolução dos teores dos principais aminoácidos do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Aminoácidos (AA) (mg/100 g ¹)	Armazenagem em congelado* (meses)		
	1	4	8
Essenciais (AAE)²			
Histidina	459,2 ± 33,9	412,1 ± 15,0	458,4 ± 27,0
Isoleucina	959,9 ± 47,2 ^b	776,5 ± 8,5 ^a	962,9 ± 97,9 ^b
Leucina	1672,6 ± 87,0	1499,3 ± 9,1	1694,1 ± 161,3
Lisina	1310,9 ± 58,3	1117,8 ± 114,0	1371,3 ± 298,5

Quadro 4.9 (cont.) Evolução dos teores dos principais aminoácidos do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Metionina	584,9 ± 38,5	546,3 ± 18,0	587,0 ± 34,6
Fenilalanina	889,4 ± 67,0	818,8 ± 46,1	884,3 ± 72,8
Treonina	813,7 ± 37,0	778,5 ± 35,8	833,5 ± 41,9
Triptofano	182,1 ± 21,5	185,5 ± 17,1	183,8 ± 16,2
Valina	880,7 ± 37,5 ^b	727,4 ± 16,3 ^a	892,0 ± 88,4 ^b
ΣAAE	7753,4 ± 371,8 ^{a,b}	6862,2 ± 134,1 ^a	7867,2 ± 739,3 ^b
Não essenciais (AANE)²			
Alanina	1159,6 ± 43,0 ^b	1058,3 ± 40,0 ^a	1218,8 ± 36,9 ^b
Arginina**	1673,4 ± 85,0 ^b	1493,9 ± 85,5 ^a	1739,4 ± 61,1 ^b
Ácido aspártico	2317,3 ± 74,1	2126,4 ± 136,9	2421,5 ± 247,0
Cistina+Cisteína**	109,3 ± 6,0	112,4 ± 12,0	107,7 ± 15,7
Ácido glutâmico	3369,4 ± 119,6 ^{a,b}	3085,5 ± 158,1 ^a	3502,0 ± 278,1 ^b
Glicina**	1554,5 ± 75,9	1390,7 ± 119,9	1693,2 ± 352,0
Prolina**	980,1 ± 50,2	923,5 ± 30,6	1045,7 ± 95,1
Serina	915,0 ± 42,8	903,2 ± 43,2	949,1 ± 24,0
Taurina**	1026,0 ± 141,6	942,8 ± 48,9	1077,1 ± 237,3
Tirosina**	869,7 ± 64,4	806,4 ± 48,2	858,4 ± 73,2
ΣAANE	13974,5 ± 601,3 ^b	12843,2 ± 465,0 ^a	14612,9 ± 283,9 ^b
ΣAAE/ ΣAA (%)	35,7 ± 0,2	34,8 ± 0,4	35,0 ± 2,4

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). ²Classificação de acordo com WHO (2007). *T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %. **Aminoácidos condicionalmente essenciais (aminoácidos que podem tornar-se essenciais em condições fisiológicas específicas ou em casos de doença), (WHO, 2007).

4.1.3.4 Minerais do polvo congelado

No Quadro 4.10 podem observar-se as concentrações de alguns macrominerais, microminerais e elementos tóxicos no polvo cozido armazenado em congelado. As alterações foram mínimas, mantendo-se o mesmo perfil de abundância que no polvo cozido, com exceção do potássio e do zinco. No que respeita ao K alguns autores sugerem que nos alimentos podem ocorrer reduções de 10% durante a armazenagem em congelado (USDA, 2003), verificando-se neste caso uma redução de cerca de 18% entre o primeiro e o oitavo mês, embora não significativa. Quanto ao Zn as flutuações observadas são devidas certamente a diferenças nas amostras analisadas. Relativamente aos elementos tóxicos (Cd e Pb) não foram observadas alterações significativas.

Quadro 4.10 Evolução dos teores de alguns macroelementos, microelementos e elementos tóxicos do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Elementos	Armazenagem em congelado* (meses)		
	1	4	8
Macro (mg/100g) ¹			
Mg	57,2 ± 1,7	58,3 ± 5,2	58,6 ± 2,0
P	205,3 ± 15,4	196,6 ± 10,7	196,2 ± 12,2
K	229,7 ± 21,6 ^{a,b}	257,8 ± 12,9 ^b	188,4 ± 26,4 ^a
Na	319,4 ± 20,0	358,6 ± 19,3	333,7 ± 50,5
Micro (mg/kg) ¹			
I	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,04
Se	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,36 ± 0,09
Cu	2,4 ± 0,2	3,6 ± 0,3	3,5 ± 1,0
Zn	17,1 ± 0,4 ^{a,b}	16,0 ± 0,5 ^a	17,9 ± 1,0 ^b
Tóxicos (mg/kg) ¹			
Cd	0,022 ± 0,005	0,018 ± 0,004	0,013 ± 0,007
Pb	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,02

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). *T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %.

4.1.3.5 Contribuição nutricional do polvo congelado

4.1.3.5.1 Proteínas

De acordo com os valores apresentados no quadro 4.11, a armazenagem em congelado (entre 1 e 8 meses) não afetou a contribuição nutricional do polvo em termos proteicos: Mais ainda, os teores dos aminoácidos essenciais foram superiores aos do padrão da FAO (2013) recomendado para adultos (> 18 anos), com exceção da valina que apresentou scores inferiores a 100%, mas mesmo assim bastante elevados (76.1% a 97,7%). Estes resultados indicam novamente que o polvo comum é uma espécie com elevada qualidade proteica que não se altera com a armazenagem em congelado.

Quadro 4.11 Evolução dos teores e scores de aminoácidos essenciais do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Aminoácidos	Concentração (mg/g de proteína)			AA Score (%) ¹			
	Padrão FAO ²	Armazenagem em congelado* (meses)			Armazenagem em congelado* (meses)		
		1	4	8	1	4	8
Histidina	15	18,1 ± 1,9	16,8 ± 0,7	19,6 ± 1,6	120,5 ± 12,6	112,0 ± 4,5	130,7 ± 11,0
Isoleucina	30	37,8 ± 3,1 ^b	31,7 ± 0,5 ^a	41,1 ± 4,2 ^b	125,9 ± 10,3 ^b	105,5 ± 1,5 ^a	137,1 ± 14,0 ^b
Leucina	59	65,8 ± 5,6 ^{ab}	61,1 ± 0,8 ^a	72,3 ± 7,0 ^b	111,5 ± 9,4 ^{ab}	103,6 ± 1,3 ^a	122,6 ± 11,8 ^b
Lisina	45	51,5 ± 3,5	45,6 ± 4,2	58,4 ± 11,4	114,5 ± 7,8	101,2 ± 9,3	129,7 ± 25,2
Metionina + Cisteína	22	27,3 ± 2,6	26,9 ± 0,7	29,7 ± 2,3	124,1 ± 11,8	122,1 ± 3,3	134,9 ± 10,5
Fenilalanina + Tirosina	38	69,2 ± 7,2	66,3 ± 4,3	74,6 ± 8,6	182,2 ± 18,9	174,5 ± 11,4	196,3 ± 22,5
Treonina	23	32,0 ± 2,5	31,7 ± 1,2	35,6 ± 2,1	139,1 ± 10,9	138,0 ± 5,1	154,8 ± 9,2
Triptofano	6	7,2 ± 1,0	7,6 ± 0,8	7,9 ± 0,8	119,3 ± 16,0	126,2 ± 13,2	130,9 ± 12,8
Valina	39	34,6 ± 2,6 ^{ab}	29,7 ± 0,5 ^a	38,1 ± 3,8 ^b	88,8 ± 6,7 ^{ab}	76,1 ± 1,2 ^a	97,7 ± 9,8 ^b

¹Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. ²Padrão FAO (2013). Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). *T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35.

4.1.3.5.2 Minerais e ácidos gordos (EPA e DHA)

As diferenças observadas na contribuição nutricional do polvo cozido armazenado em congelado, em termos de elementos minerais e EPA+DHA, tendo como referência o consumo de uma porção de 150 g, são reduzidas e, naturalmente, refletem pequenas variações nos teores dos diferentes constituintes considerados (Quadro 4.12). Assim, é de destacar que as considerações feitas em 4.1.2.5.2 para o polvo cozido não foram alteradas com a armazenagem em congelado.

Quadro 4.12. Contribuição nutricional do polvo comum cozido armazenado em congelado em termos de elementos minerais e EPA+DHA, tendo como referência o consumo de uma porção de 150 g.

Elementos e ácidos gordos	Adultos	DDR ¹ (mg/dia)	Contribuição nutricional (%)		
			Armazenagem em congelado*		
			1	4	8
Macroelementos					
Mg	Homem	350 ³	24,5 ± 0,7	25,0 ± 2,2	25,1 ± 0,9
	Mulher	300 ³	28,6 ± 0,8	29,1 ± 2,6	29,3 ± 1,0
P	Homem/Mulher	550 ⁴	56,0 ± 4,2	53,6 ± 2,9	53,5 ± 3,3
K	Homem/Mulher	3500 ⁵	9,8 ± 0,9 ^{a,b}	11,0 ± 0,6 ^b	8,1 ± 1,1 ^a
Na	Homem/Mulher	2000 ⁶	31,9 ± 2,0	35,9 ± 1,9	33,4 ± 5,0
Microelementos					
Cu	Homem	1,6 ⁷	22,4 ± 2,2	33,5 ± 2,9	32,4 ± 9,4
	Mulher	1,3 ⁷	27,6 ± 2,7	41,2 ± 3,5	39,8 ± 11,5
Zn	Homem	9,4 ⁸	27,3 ± 0,6 ^{a,b}	25,6 ± 0,9 ^a	28,5 ± 1,5 ^b
	Mulher	7,5 ⁸	34,2 ± 0,8 ^{a,b}	32,1 ± 1,1 ^a	35,7 ± 1,9 ^b
Se	Homem/Mulher	0,07 ⁹	77,0 ± 4,4	79,4 ± 8,6	76,1 ± 19,8
I	Homem/Mulher	0,15 ¹⁰	12,3 ± 1,3	12,2 ± 0,7	11,7 ± 4,5
Ácidos gordos ómega 3					
EPA+DHA	Homem/Mulher	250 ¹¹	175,9 ± 4,7 ^a	181,3 ± 10,9 ^a	198,8 ± 5,9 ^b

¹Dose diária de referência para adultos; ²Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão; ³EFSA, 2015a; ⁴EFSA,2015b; ⁵EFSA, 2016; ⁶EFSA, 2019; ⁷EFSA, 2015c; ⁸considerando um nível de ingestão de fitato de 300 mg/dia (EFSA, 2014a); ⁹EFSA, 2014b; ¹⁰EFSA, 2014c; ¹¹Dose recomendada considerando a saúde cardiovascular (EFSA, 2015d). Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). *T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %.

4.1.3.6 Textura do polvo congelado

A textura das amostras de polvo cozido armazenadas em congelado foi determinada por dois tipos de testes - compressão e mordida (bite jaw) (duas dentadas) -, permitindo aceder a um vasto conjunto de atributos. Com o teste de compressão avaliaram-se 5 parâmetros (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e mastigabilidade) e com o teste bite jaw foi avaliada a tenrura e a firmeza, encontrando-se ambos os resultados no quadro 4.13. Estes resultados indicam a não existência de uma evolução significativa ao longo da armazenagem em congelado durante 8 meses no que respeita aos parâmetros dureza, adesividade, elasticidade, tenrura e firmeza. A dureza, que representa a força necessária para deformar o produto numa determinada distância, ou seja, a força para comprimir entre os molares, morder com os incisivos ou comprimir entre a língua e palato, registou uma gradual diminuição (175,2 N ao fim

do primeiro mês para 137,1 N após oito meses), embora esta redução, tal como referido, não seja considerada significativa, provavelmente devido a alguma heterogeneidade das amostras. Por seu lado para a coesividade, verificou-se uma alteração significativa ($p < 0,0253$) a partir do segundo mês de armazenagem (0,74) que se manteve até ao final (0,69). Esta diferença refletiu-se na mastigabilidade (parâmetro que corresponde ao esforço necessário para mastigar um alimento até uma consistência adequada para engolir), característica secundária que depende também da coesividade, que apresenta diferenças significativas ($p < 0,0492$) para os mesmos grupos.

Estes resultados eram esperados porque as principais alterações da textura ocorreram durante a congelação prévia e durante a cozedura. Segundo Reyes et al. (2009) a congelação prévia induz, por um lado, uma ligeira compactação no tecido muscular, originando maiores espaços intercelulares produzidos pela formação de cristais de gelo, rodeando o tecido conjuntivo envolvente, que favorecem a tenrura do polvo e, por outro, danifica a miosina e a paramiosina (uma proteína encontrada unicamente nos músculos estriados de invertebrados e que está envolvida na contração muscular, Venugopal, 2006). Por outro lado, o tratamento térmico causa a desnaturação das proteínas o que leva à agregação aleatória e desidratação das fibras musculares, à solubilização do colágeno e à perda de água, acabando por tornar o produto suficientemente tenro para poder ser consumido. Deste modo, é expectável que os fatores que potenciam as modificações usuais de textura durante a armazenagem em congelado do pescado - desnaturação proteica, oxidação lipídica, sublimação e recristalização de cristais de gelo -(Nakazawa e Okazaki, 2020) tenham um efeito menor sobretudo para tempos de armazenagem inferiores a um ano.

Outros autores verificaram que para a mesma espécie de polvo cru não ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$) durante a armazenagem em congelado durante 30 dias nos cinco parâmetros analisados: dureza, coesividade, mastigabilidade, elasticidade e coesividade (Gokoglu et al., 2018). De acordo com estes autores o comportamento do polvo, durante a armazenagem em congelado é diferente do choco (*Sepia officinalis*) e da lula (*Loligo vulgaris*), uma vez que nestes cefalópodes ocorreram alterações significativas em alguns parâmetros de textura durante a armazenagem em congelado pelo mesmo período.

Quadro 4.13. Evolução da textura do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Testes	Armazenagem em congelado* (meses)				
	1	2	4	6	8
Compressão					
Dureza (N)	175,23±32,35 ^a	176,72±18,43 ^a	151,59±12,94 ^a	141,17±8,76 ^a	137,10±12,83 ^a
Adesividade (N,mm)	-0,22±0,26 ^a	-0,28±0,43 ^a	-0,22±0,23 ^a	-0,10±0,12 ^a	-0,21±0,21 ^a
Elasticidade	0,81±0,03 ^a	0,78±0,01 ^a	0,81±0,02 ^a	0,82±0,03 ^a	0,82±0,01 ^a
Coesividade	0,74±0,02 ^a	0,75±0,01 ^a	0,66±0,03 ^b	0,69±0,02 ^b	0,69±0,01 ^b

Quadro 4.13 (cont.) Evolução da textura do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Mastigabilidade (N)		104,03±15,32 ^a	103,01±12,44 ^a	81,15±6,24 ^b	81,08±4,31 ^b	77,83±7,17 ^b
Mordida (Bite jaw)						
Tenrura (N.s)	na	59,10±19,20 ^a	69,41±10,71 ^a	78,75±4,25 ^a	75,74±23,27 ^a	
Firmeza (N)	na	43,60±4,26 ^a	35,13±3,49 ^a	40,26±6,13 ^a	39,29±9,06 ^a	

Valores são médias ± desvio padrão (n≥4). Diferentes letras sobrescritas na mesma linha representam diferenças estatísticas (p<0.05). na – não avaliada. *T=-16,18±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %.

Estes resultados evidenciam que o polvo cozido, previamente amaciado por congelação, armazenado em congelado por um período de oito meses é um produto muito estável em termos de textura.

4.1.3.7 Características sensoriais do polvo congelado

A evolução das características sensoriais do polvo cozido armazenado em congelado encontra-se representada na figura 4.3. Não foram observadas alterações significativas para nenhum dos atributos, sendo de referir a manutenção do sabor típico, suculência e cor típica, atributos muito importantes para a aceitação dos consumidores bem como o não desenvolvimento de cor, sabor e cheiro alterados. No que respeita à desidratação, que é uma alteração frequente nos produtos congelados, é importante realçar que os provadores não perceberam sinais desta alteração pois a pontuação situou-se entre ausente e ligeira (0 e 1). A suculência que é também afetada em muitos produtos armazenados em congelado, foi pontuada como moderada desde o início até ao final da armazenagem (2 e 3). A tenrura foi classificada como ligeira/moderada e o sabor a sal não se acentuou ao longo do tempo tendo sido considerado moderado.

Vários autores observaram alterações sensoriais muito rápidas durante a armazenagem em congelado de cefalópodes não cozinhados. Manimaran et al. (2016) verificaram que o polvo indiano (*Cistopus indicus*) congelado e armazenado em congelado com e sem qualquer pré-tratamento (à base de citrato de sódio) exibiu boas características sensoriais durante a armazenagem em congelado até ao dia 40, quando os valores QIM atingiram, respetivamente 3,50 e 2,25 (em que o valor máximo numa escala de demérito era 10), tendo a degradação evoluído negativamente até ao dia 80.

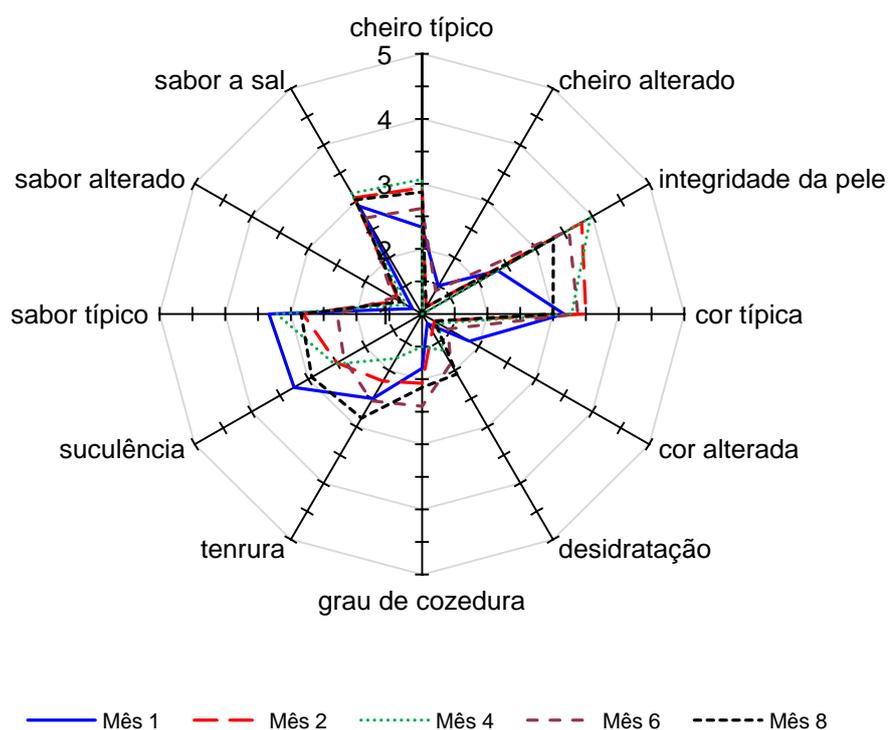


Figura 4.3 Evolução do perfil sensorial do polvo cozido durante a armazenagem em congelado ($T=-16,18\pm0,60$ °C e $HR=83,11\pm3,35$ %). Os resultados correspondem a valores médios ($0,00\leq DP\leq 0,98$) obtidos usando uma escala de intensidade de atributos de cinco pontos: 1 (ausente) a 5 (muito intenso) (Anexo 1).

Estes autores verificaram ainda que os atributos textura e cor da pele foram os mais afetados. Shanmugam (2014) observou alterações muito relevantes no cheiro e sabor da lula *Septoteuthis lessoniana* mesmo quando foram utilizadas condições de vidragem especiais para prevenir a degradação. Benjakul et al. (2012) observaram importantes alterações na cor durante o armazenamento de lulas (*Loligo formosana*) em congelado, tendo, todavia, verificado que um tratamento prévio com NaCl (3%) e H_2O_2 (0,5%) contribuiu para evitar esta alteração. Thanonkaew et al. (2008) concluíram que tratamentos prévios com antioxidantes podem ter um efeito muito positivo na manutenção das características sensoriais do choco (*Sepia pharaonis*) armazenado em congelado. A principal diferença entre este estudo e os restantes autores resulta de se estar a avaliar polvo congelado.

4.1.3.8 Características microbiológicas do polvo congelado

A evolução das contagens microbiológicas durante a armazenagem em congelado de polvo cozido encontra-se no quadro 4.14. Os valores para o polvo cru mostram que a qualidade da matéria prima era muito boa e os do polvo cozido indicam que a preparação e cozedura foram

muito eficientes e que as boas práticas de higiene foram cumpridas. No que respeita às contagens totais viáveis do polvo cozido congelado, não se verificaram alterações significativas. Por seu lado, para os coliformes e *E. coli*, que são muito sensíveis à congelação, não foi possível a quantificação (<1,0 log UFC/g) bem como para os mesófilos aeróbios totais esporulados e *Enterobacteriaceae*. Como é sabido, as alterações microbiológicas, para além da temperatura e suas flutuações, são potenciadas por maiores percentagens de água disponível para ser usada pelos microrganismos e, por outro lado a sensibilidade dos microrganismos a baixa temperatura é bastante diversa (por exemplo as Gram negativas são menos resistentes do que as Gram positivas) (Lund et al., 2000). Neste caso, como o polvo já tinha sido cozido, a percentagem de água disponível foi menor, sendo assim expectável uma reduzida atividade microbiológica.

Quadro 4.14 Evolução microbiológica do polvo comum cozido armazenado em congelado.

Microrganismos	Polvo cru	Polvo cozido	Armazenagem em congelado* (meses)		
			1	4	8
Viáveis totais a 30 °C(log ufc/g)	4,1±3,5 ^a	2,3±1,9 ^b	2,1±0,3 ^b	2,3±0,5 ^b	2,1±0,3 ^b
Coliformes totais e <i>Escherichia. coli</i> (log ufc/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Mesófilos aeróbios totais esporulados (log ufc/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Valores são médias ± desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha representam diferenças estatísticas (p<0.05). *T=-16,18 ±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %.

Kumar et al. (2015) verificaram, para lula (*Sepioteuthis lessoniana*) não cozinhada armazenada em congelado, uma evolução das contagens totais entre 2,88 log ufc/g (mês 1) e 3,15 log ufc/g (mês 7). No que respeita aos coliformes totais e *E. coli* também observaram que os valores foram <1,0 log ufc/g.

4.1.3.9 Qualidade do caldo de cozedura congelado

4.1.3.9.1 Composição em minerais

Os teores dos minerais mais abundantes no caldo de cozedura congelado foram 246,70±9,85 (Mg), 1265,02±68,21 (K) e 2082,30±97,79 mg/L para o Na. Importa ter em conta que as retenções destes minerais no polvo foram respetivamente de 51,6%, 48,6% e 44,6 % para Mg, K e Na. De acordo com Sobral et al. (2018) o comportamento dos minerais durante a confeção culinária do pescado é errático, mas Gokoglu et al. (2004) e Hosseini et al. (2014) referem diminuições dos teores de Na, K, Mg, e Zn no ciprinídeo *Rutilus kutum* e na truta arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

4.1.3.9.2 Cor

A evolução da cor do caldo de cozedura durante a armazenagem em congelado também a $-16,18 \pm 0,60$ °C, encontra-se no quadro 4.15. Verificou-se que os valores do parâmetro L^* foram sempre inferiores a 50, o que confirma a baixa luminosidade observada por avaliação sensorial. Por outro lado, verificou-se uma diminuição significativa deste parâmetro ao longo do tempo ($p < 0,0001$), provavelmente devido a uma agregação crescente das partículas em suspensão e também a alguma oxidação dos pigmentos que contribuiu para algum escurecimento. Relativamente ao parâmetro a^* , os valores foram sempre positivos, tendo-se verificado uma estabilidade da cor avermelhada até ao sexto mês, seguida de uma diminuição significativa ($p < 0,0172$) até ao oitavo mês de armazenagem, o que indica algum escurecimento. O parâmetro b^* evidenciou maior variabilidade, mas os valores situaram-se sempre na zona dos amarelos (valores positivos), verificando-se um aumento significativo da intensidade do carácter amarelado logo a partir do segundo mês de armazenagem em congelado. Como era de esperar estas evoluções dos parâmetros a^* e b^* manifestaram-se no valor do croma, verificando-se que a saturação/intensidade da cor do caldo de cozedura diminuiu significativamente após o sexto mês de armazenagem. Os valores de hue evidenciam que inicialmente o caldo tinha coloração avermelhada (ângulos de 10 graus) que se alterou significativamente para uma coloração mais próxima do vermelho - alaranjado (ângulos no intervalo 30 - 40) a partir do 4º mês de congelação e que se manteve até ao final do tempo de armazenagem.

Quadro 4.15 – Evolução da cor do caldo de cozedura do polvo comum armazenado em congelado.

Parâmetros da cor	Tempo de armazenagem em congelado* (meses)			
	2	4	6	8
L^*	$41,13 \pm 0,27^a$	$37,92 \pm 0,77^b$	$36,25 \pm 1,21^c$	$33,85 \pm 0,31^d$
a^*	$10,97 \pm 0,38^a$	$9,79 \pm 1,73^a$	$9,64 \pm 1,47^a$	$7,17 \pm 0,78^b$
b^*	$2,07 \pm 0,27^a$	$6,30 \pm 1,32^b$	$6,04 \pm 0,89^b$	$4,03 \pm 0,38^c$
Hue (°)	$10,7 \pm 1,0^a$	$29,6 \pm 1,3^b$	$32,1 \pm 1,2^b$	$29,4 \pm 1,1^b$
Croma	$11,16 \pm 0,41^{a,b}$	$11,64 \pm 2,15^{a,b}$	$11,37 \pm 1,70^a$	$8,23 \pm 0,85^b$

Valores são médias \pm desvio padrão ($n \geq 4$). Diferentes letras sobscritas na mesma linha representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). *T= $-16,18 \pm 0,60$ °C e HR= $83,11 \pm 3,35$ %.

4.1.3.9.3 Perfil sensorial

A evolução do perfil sensorial do caldo de cozedura, realizada por provadores treinados, revelou uma grande estabilidade dos atributos (cor alaranjada, cheiro típico, outro cheiro, sabor típico a polvo cozido, outro sabor e sabor a sal) ao longo da armazenagem em congelado como

se pode observar na figura 4.4. Sendo de referir que os provadores não detetaram uma diminuição da cor como indicava o valor do croma entre o sexto e o oitavo mês nem da coloração avermelhada que se alterou significativamente para vermelho - alaranjado (ângulos no intervalo 30 - 40) a partir do 4º mês de congelação. A manutenção do cheiro e sabor típico pode, em parte, ser devida à presença de teores elevados dos iões Na^+ e K^+ cuja contribuição é indispensável para o sabor intrínseco de crustáceos e moluscos (Sarower et al., 2012). Ainda segundo estes autores, os aminoácidos treonina, glicina e alanina conferem sabor adocicado e, efetivamente, a glicina foi um dos aminoácidos que mais passou para o caldo de cozedura, pois a taxa de retenção foi baixa (cerca de 65,7%) (Quadro 4.3). No que respeita à taurina, verificou-se uma baixa retenção (43,4%, Quadro 4.3), podendo este aminoácido ter também contribuído para a manutenção do cheiro e sabor caraterísticos do polvo.

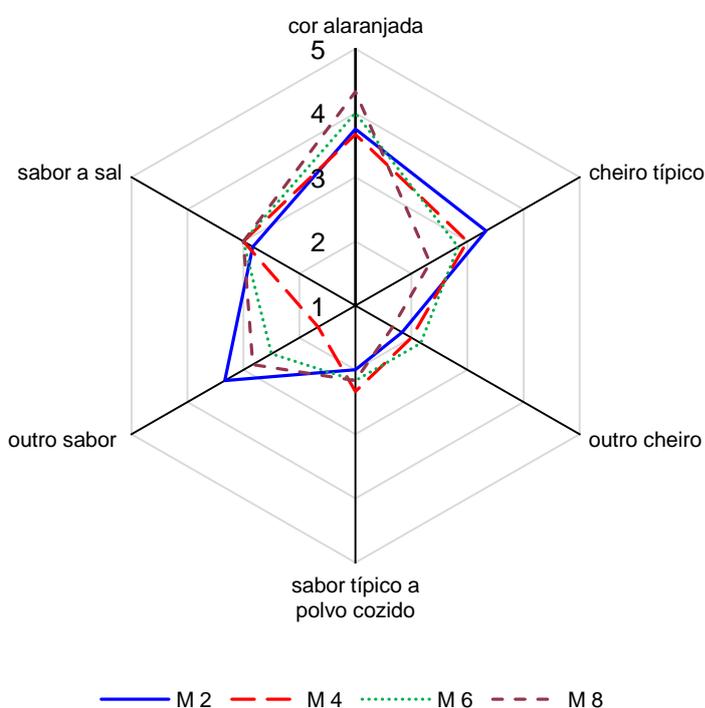


Figura 4.4. Perfil sensorial do caldo de cozedura do polvo comum durante a armazenagem em congelado ($T=-16,18\pm 0,60$ °C e $HR=83,11\pm 3,35$ %). Os resultados correspondem a valores médios ($0,00\leq DP\leq 1,33$), usando uma escala de intensidade de atributos de cinco pontos: 1 (ausente) a 5 (muito intenso) (Anexo 1).

4.1.3.9.4 Caraterísticas microbiológicas

A evolução das contagens microbiológicas durante a armazenagem em congelado do caldo de cozedura do polvo encontra-se no quadro 4.16. Os valores obtidos estão de acordo com os já indicados para o polvo cozido, revelando uma excelente estabilidade microbiológica e que a preparação e cozedura foram muito eficientes e que as boas práticas de higiene foram cumpridas.

Quadro 4.16 Evolução microbiológica do caldo de cozedura do polvo comum durante a armazenagem em congelado.

Microrganismos	Após cozedura	Armazenagem em congelado* (meses)		
		1	4	8
Viáveis totais (log ufc/g)	0,7±0,2	0,7±0,2	1,0±0,3	1,0±0,1
Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> (log ufc/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Mesófilos aeróbios totais esporulados (log ufc/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Valores são médias ± desvio padrão. Diferentes letras sobscritas na mesma linha representam diferenças estatísticas (p<0.05). *T=-16,18 ±0,60 °C e HR=83,11±3,35 %.

4.2 Conservação de robalo em refrigerado e congelado

O robalo é uma espécie de peixe muito valorizada, consumida sobretudo inteira/eviscerada em fresco, embora se registre uma procura crescente de filetes frescos e congelados (FAO, 2017). Pode provir da pesca, no entanto a maior parte provem da aquacultura (>96% em 2016) (EUMOFA, 2019), sendo uma das principais espécies aquícolas do Sul da Europa, Turquia e alguns países do Norte de África, nomeadamente o Egito. A Grécia, Portugal e Chipre têm sido os países com maior consumo per capita (796, 680, e 643 g, respetivamente), seguidos pela Espanha e Itália (545 e 513 g) (EUMOFA, 2019). Tal como referido anteriormente, o robalo possui músculo claro, sabor suave, textura firme e com “lascas” e baixo teor de gordura. Devido às suas excelentes características organoléticas tem um elevado valor de mercado, sendo importante prolongar o tempo de vida útil quer em refrigerado quer em congelado.

Assim, considera-se que o recurso a revestimentos edíveis para possibilitar a disponibilização de filetes frescos (refrigerados) ou congelados de robalo com maior tempo de vida útil, pode contribuir para valorizar esta espécie tão apreciada.

4.2.1 Seleção do revestimento mais adequado

Com base na literatura sobre o uso de revestimentos para prolongar o tempo de vida útil de pescado (por exemplo, Socaciu et al., 2018, Yu et al., 2017, Kazemi, et al., 2015, Volpe et al., 2015, Qiu et al., 2014, Li et al., 2013, Gómez-Estaca et al., 2009), foram selecionados o iota carragenato e o quitosano para usar neste trabalho, por se terem revelado muito adequados. Por outro lado, segundo a EFSA ingestões de quitosano até 3 g/dia têm importantes vantagens nutricionais, nomeadamente a manutenção das concentrações normais do colesterol LDL (EFSA, 2011) e, no que respeita ao carragenato (E407), a ingestão diária aceitável é de 75 mg/kg massa corporal/dia, valor considerado temporário pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2018). Também foi opção usar apenas estes compostos sem recurso à incorporação de agentes antioxidantes ou antimicrobianos no revestimento. Para selecionar o revestimento e as condições de aplicação foram realizados ensaios prévios a fim de escolher: i) o melhor revestimento - carragenato ou quitosano - para os filetes de robalo; ii) a concentração da solução de revestimento; e iii) o tempo de imersão para obtenção de uma superfície de revestimento homogénea. Para isso, ambos os compostos foram testados nos níveis de concentração de 0,5, 1 e 1,5% variando também os tempos de imersão entre 10, 30 e 60 segundos. Na figura 4.5 exemplifica-se o aspeto dos diferentes pedaços de filete tratados com quitosano e os resultados obtidos para as quantidades das soluções de carragenato e quitosano retidas (% e mg/100 g de filete) encontram-se nas figuras 4.6 e 4.7, respetivamente.

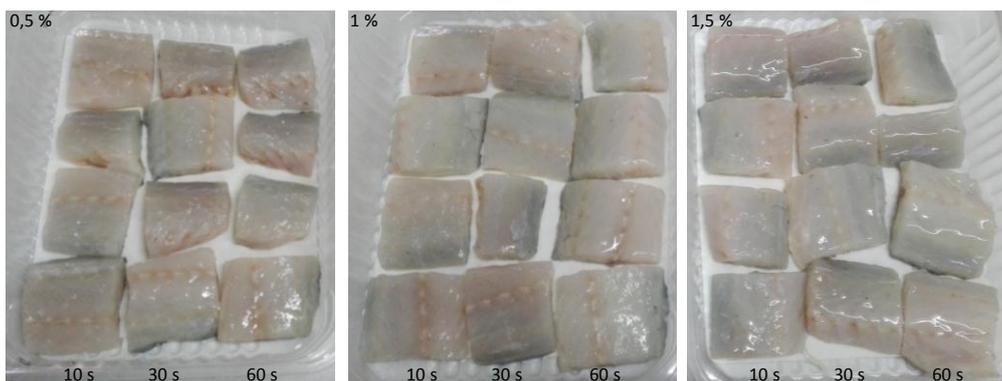


Figura 4.5. Aspeto dos pedaços de filetes tratados com quitosano nas diferentes condições.

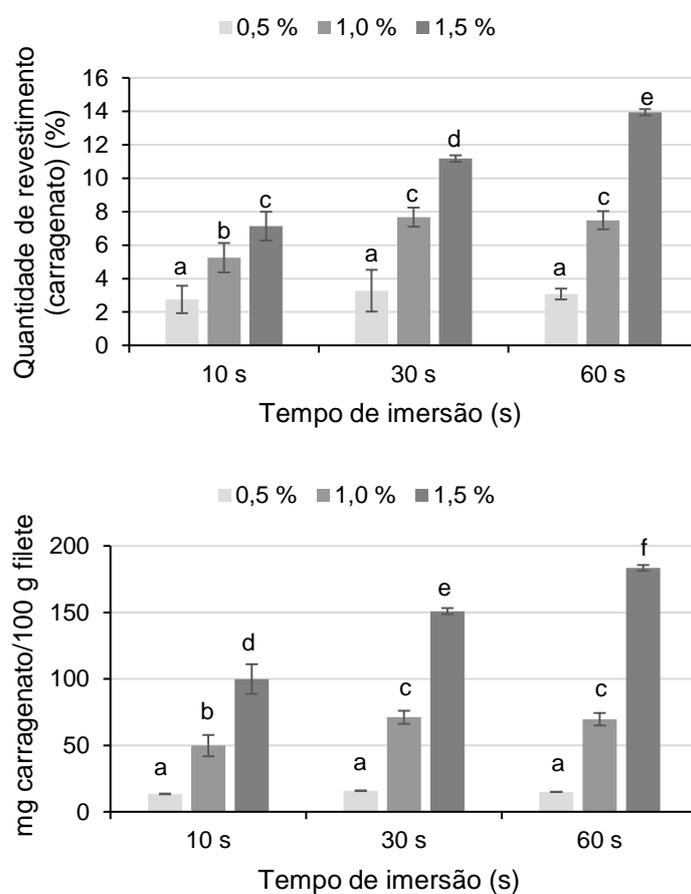


Figura 4.6. Evolução dos valores médios da percentagem de revestimento de carragenato retido nos filetes ($0,07 \leq DP \leq 0,88$) e da quantidade de carragenato nos filetes ($mg/100\ g$) ($0,33 \leq DP \leq 11,24$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

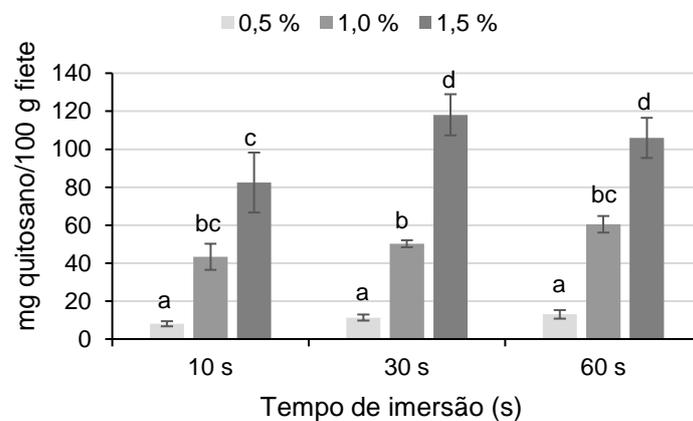
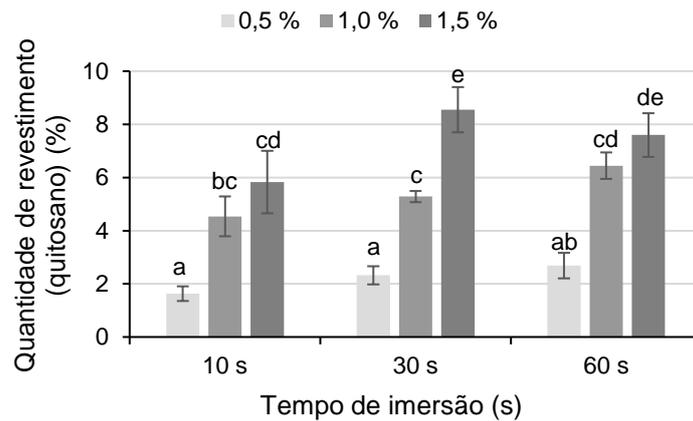


Figura 4.7. Evolução dos valores médios da percentagem de revestimento de quitosano retido nos filetes ($0,21 \leq DP \leq 1,18$) e da quantidade de quitosano nos filetes (mg/100 g) ($1,36 \leq DP \leq 15,75$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos permitiram concluir que a quantidade de revestimento aumentava em função da concentração da solução aplicada, quer no caso do carragenato quer para o quitosano, enquanto que o tempo de imersão não influenciou a retenção do revestimento. Além disso as percentagens de retenção foram significativamente superiores no caso do carragenato, embora a aderência fosse fraca, verificando-se um intenso (indesejável) exsudado após algumas horas de imersão. Por outro lado, observou-se que os pedaços de filetes revestidos com as soluções de carragenato ficavam muito esbranquiçados e opacos em comparação com os que não tinham sido sujeitos a revestimento e com os revestidos com quitosano. Por seu lado, as soluções de quitosano aderiram bem à superfície do filete, mesmo nas concentrações mais elevadas, proporcionando um revestimento transparente. No entanto com 1,5 % (em todos os tempos de imersão), o revestimento tornava o filete menos apelativo e com muito brilho.

Assim, o quitosano foi considerado mais adequado e as condições selecionadas foram imersão durante 10 segundos em soluções a 1,0% porque proporcionava uma boa aderência, aspeto uniforme, ausência de cheiro e um revestimento homogêneo aos filetes, tornando-os mais idênticos aos filetes sem revestimento – aspeto visual característico. Estas condições foram usadas nos ensaios posteriores de refrigeração e congelação. A contribuição da quantidade de quitosano presente num filete com 150 g (valor usual) para o nível de ingestão considerado pela EFSA (2011), foi baixa (inferior a 3%).

4.2.2 Conservação em refrigerado de filetes de robalo revestidos com quitosano

4.2.2.1 *Dados biométricos e composição química do robalo*

Neste estudo, usaram-se robalos de aquacultura (n=60) da gama 400-600 g. A massa média dos filetes foi de $201,4 \pm 12,3$ g e o rendimento médio na filetagem foi de $46,8 \pm 2,9\%$.

A composição química aproximada da parte edível encontra-se no quadro 4.17. O teor em água era semelhante aos publicados por Fuentes et al. (2012) para o robalo da Grécia (G) (74,56%), e ligeiramente inferior aos do robalo de Espanha (E) (76,70%) e selvagem (S) (77,49%). Por seu lado, o teor de proteína (15,12%) foi também semelhante ao encontrado no robalo G, superior ao E e inferior ao S. O teor em gordura era da mesma ordem de grandeza que o observado no G e E e significativamente superior ao do robalo selvagem. Os teores mais elevados de gordura no robalo de aquacultura em relação ao selvagem têm sido referidos por muitos autores (citados por Fuentes et al., 2012) e resultam de vários fatores, nomeadamente rações com elevados teores de gordura e inclusão de hidratos de carbono. No que respeita à cinza não foram encontradas diferenças significativas entre o robalo deste estudo e os robalos G, E e S.

4.2.2.2 *Evolução da composição química aproximada*

Como se pode observar no quadro 4.17 não houve efeito significativo ($P > 0,05$) do tempo de armazenamento em refrigerado dos filetes de robalo com e sem revestimento nos teores de humidade e cinza. Quanto à proteína houve uma ligeira, mas significativa ($P < 0,05$), diferença nos filetes controlo (após 2 dias de armazenagem), contrariamente ao verificado nos filetes revestidos. Alguns autores referem diminuições do teor proteico durante a conservação em refrigerado (Munasinghe et al. 2005; Reza et al. 2008; Dey e Dora 2010), indicando como potencial causa a lixiviação de alguma proteína solúvel pela água que se liberta do músculo do peixe. No que respeita ao teor em gordura, observou-se uma evolução errática, considerando-se que as pequenas diferenças indicadas resultam mais de alguma heterogeneidade das amostras do que do processo.

Quadro 4.17. Composição química aproximada inicial da parte edível do robalo e dos filetes ao longo da conservação em refrigerado.

Composição química aproximada (g/100 g)	Ensaio	Inicial	Conservação em refrigerado (dias)		
			2	5	7
Humidade	CTR	75,27±1,49 ^a	74,15±1,04 ^a	75,86±0,74 ^a	73,45±3,22 ^a
	QUIT		73,42±0,37 ^a	74,60±3,07 ^a	75,72±1,55 ^a
Proteína	CTR	15,12±0,15 ^a	16,71±0,37 ^b	nd	16,07±0,13 ^b
	QUIT		15,12±0,35 ^a	nd	14,53±0,33 ^a
Gordura	CTR	4,23±1,24 ^{abc}	3,43±0,02 ^{ab}	3,42±0,05 ^{ab}	5,18±0,33 ^c
	QUIT		4,84±0,39 ^{bc}	5,02±0,41 ^c	3,04±0,19 ^a
Cinza	CTR	1,12±0,03 ^a	1,16±0,05 ^a	1,14±0,02 ^a	1,03±0,29 ^a
	QUIT		1,10±0,02 ^a	1,06±0,13 ^a	1,23±0,07 ^a

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão; Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). nd - não determinado. CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

4.2.2.3 Evolução do azoto básico volátil total (ABVT) e de trimetilamina (ATMA)

Ao longo da conservação em refrigerado do pescado vão sendo produzidos compostos azotados voláteis que lhe conferem cheiro desagradável, resultantes de atividades autolíticas e bacterianas. Entre estes compostos destacam-se a amónia e a TMA pois são os principais responsáveis pelo cheiro tipo amoniacal e forte a peixe, característicos de pescado deteriorado (Huss et al., 1997). A amónia forma-se através da degradação/desaminação bacteriana de proteínas, péptidos e aminoácidos, podendo ser também produzida como resultado da autólise da adenosina monofosfato em produtos da pesca refrigerados. Apesar da amónia estar identificada como um componente volátil numa grande variedade de espécies de peixe deterioradas, poucos são os estudos que a quantificam, uma vez que é difícil determinar a sua contribuição relativa para o aumento global do ABVT (Huss et al., 1997). Assim, o ABVT e o ATMA são os indicadores mais usados. Os resultados obtidos para o ABVT durante a conservação em refrigerado do lote controlo (figura 4.6) mostram uma evolução ligeira entre o início (17,45 mg/100 g) e o segundo dia (22,15 mg/100 g) a que se seguiu um aumento significativo ($P < 0,01$) até ao quinto dia (33,64 mg/100 g). Entre este e o sétimo dia o valor de ABVT mais do que duplicou, tendo sido atingido 75,87 mg/100 g. A gama 30-35 mg/100 g, usualmente considerada como intervalo limite para a maioria das espécies de peixe (EU, 2008), foi verificada após cinco dias de conservação em refrigerado. Sharifian et al. (2014) observaram valores sempre inferiores a 30 mg/100 g até ao décimo dia de armazenagem em refrigerado a 4 °C para a garoupa (*Epinephelus coioides*) e Chudasama et al. (2018) encontraram para a cavala indiana (*Rastrelliger kanagurta*) valores ao redor de 26 mg/100 g ao fim de sete dias de armazenagem a temperaturas entre 2-7 °C. No que respeita aos valores de ABVT nos filetes revestidos com quitosano, verificou-se que o valor limite apenas foi ultrapassado no sétimo dia (33,59 mg/100 g), indicando que o revestimento teve um efeito positivo na taxa de formação de compostos azotados voláteis. Importa

realçar que o ABVT determina, em simultâneo, a presença de diversas substâncias, o que lhe confere alguma legitimidade como índice de frescura ou de qualidade. No entanto, pelo facto de algumas substâncias quantificadas por este índice só se formarem numa fase tardia da degradação, este é normalmente referido como sendo um valor indicativo da degradação e não do grau de frescura.

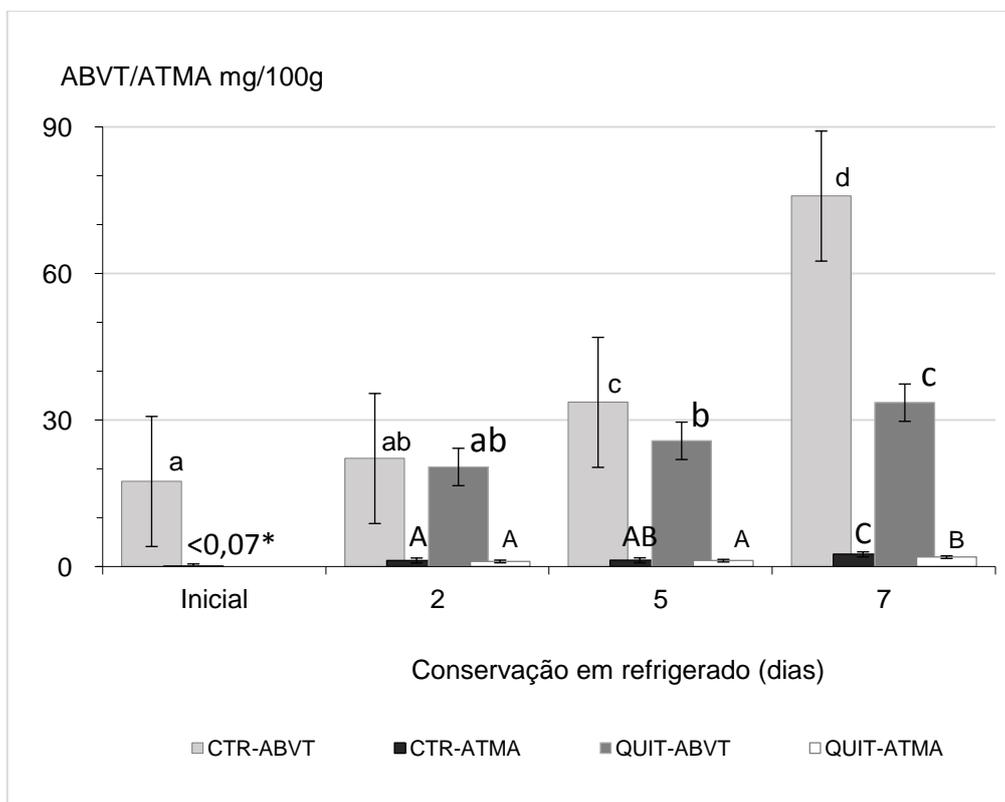


Figura 4.8. Evolução dos valores médios de ABVT e do ATMA ($0,7 \leq DP \leq 4,7$ para o ABVT e $0,0 \leq DP \leq 0,4$ para o ATMA) em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). *Valor inferior ao limite de quantificação da ATMA. CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

Os valores de ATMA variaram entre $<0,07$ (início) e 2,54 nos filetes CTR (sétimo dia) enquanto que nos filetes QUIT a evolução foi ligeiramente menos acentuada (figura 4.8). Apenas ao sétimo dia de conservação em refrigerado se verificaram diferenças significativas entre os dois tipos de filetes, indicando que o quitosano retardou a formação do ATMA na última fase da conservação. As concentrações de ATMA na maioria das espécies de pescado não atingem o valor limite de 5 mg de ATMA/100 g proposto por Connell (1975), embora alguns autores considerem que o limite de rejeição possa estar situado entre 5 - 10 mg de ATMA/100 g (Sikorski et al., 1990). Apesar de se pensar que a formação de TMA está relacionada com a ação das bactérias degradativas, a verdade é que a quantidade formada deste composto e o número destas bactérias nem sempre se correlacionam da melhor maneira. Existe evidência de que a formação de ATMA resulta da redução do OTMA por ação

bacteriana associada a um pequeno número de bactérias degradativas específicas, que nem sempre representam uma proporção elevada no teor total de bactérias presentes no pescado, mas que são capazes de produzir uma grande quantidade de ATMA. No decorrer da conservação em refrigerado, a redução de OTMA a TMA deve-se geralmente à ação bacteriana, associada às espécies *Shewanella putrefaciens* e *Photobacterium phosphoreum*, produzindo, no entanto, esta última 10 a 100 vezes mais ATMA do que a *Shewanella putrefaciens* (Huss et al., 1997). A acumulação de ATMA também depende das características intrínsecas de cada espécie de peixe, nomeadamente da sua condição e tamanho (Huss et al., 1997).

4.2.2.4 Evolução da textura

Como se pode observar na figura 4.9 a dureza dos filetes CTR e QUIT diminuiu ao longo do tempo de conservação, todavia as principais diferenças registaram-se entre o quinto para o sétimo dia. Assim, entre estes dois dias a dureza passou de $2,78 \pm 0,73$ para $1,37 \pm 0,41$ N no caso do CTR e de $3,06 \pm 0,25$ N para $2,08 \pm 0,41$ N no grupo QUIT. Os valores médios de coesividade e elasticidade não variaram significativamente ($P < 0,05$) ao longo do tempo, nem foram afetados pelo revestimento, sendo 0,52 e 0,80, respetivamente. Estes resultados permitem concluir que a presença do quitosano retarda a degradação da textura sobretudo numa fase mais avançada da conservação. Sun et al. (2018) determinaram valores de dureza semelhantes aos do robalo CTR em filetes de peixe mandarim (*Siniperca chuatsi*), respetivamente 3,1 e 0,96 N no primeiro e quinto dias de armazenagem em refrigerado a 4 °C. Por seu lado, os valores médios de coesividade e elasticidade também foram da mesma ordem de grandeza dos observados neste estudo, respetivamente 0,5 e 0,6. Como referido na introdução, o músculo do peixe possui uma estrutura muscular bastante complexa, estando esta dividida em miótomos por membranas de tecido conjuntivo ou mioseptos, dispostos paralelamente ao longo do corpo do animal. As características reológicas do músculo são assim influenciadas pelas miofibrilas e pelas proteínas do tecido conjuntivo cuja integridade depende das proteínas estruturais, podendo pequenas alterações provocar uma alteração notória na textura do pescado. Assim, a diminuição da dureza resulta do avançar do estado de degradação, que torna o músculo do filete menos firme e com menor resistência à compressão, que se intensifica à medida que as reações autolíticas induzem um amolecimento do músculo e alguma solubilização do tecido conjuntivo. Ayala et al. (2011) observaram alterações na textura de dourada *Sparus aurata*, sobretudo diminuições na dureza e coesividade durante a armazenagem em refrigerado a 4 °C e consideraram que esta alteração pode ter sido devida à degradação do colagénio e proteínas do citoesqueleto pela ação de enzimas endógenas. Liu et al. (2013) verificaram também uma diminuição significativa da dureza de filetes de carpa armazenados a temperatura entre -3 ° e 0 °C nos primeiros 3 dias. Hassoun e Karoui (2016) relataram que a coesividade de filetes de badejo (*Merlangius merlangus*) não exibiu nenhuma alteração significativa a 4 °C ao longo de 15 dias e Gao et al. (2014) relataram diminuições significativas para os valores médios de dureza, mastigabilidade e elasticidade para uma espécie de pampo da Flórida ao longo de 15 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

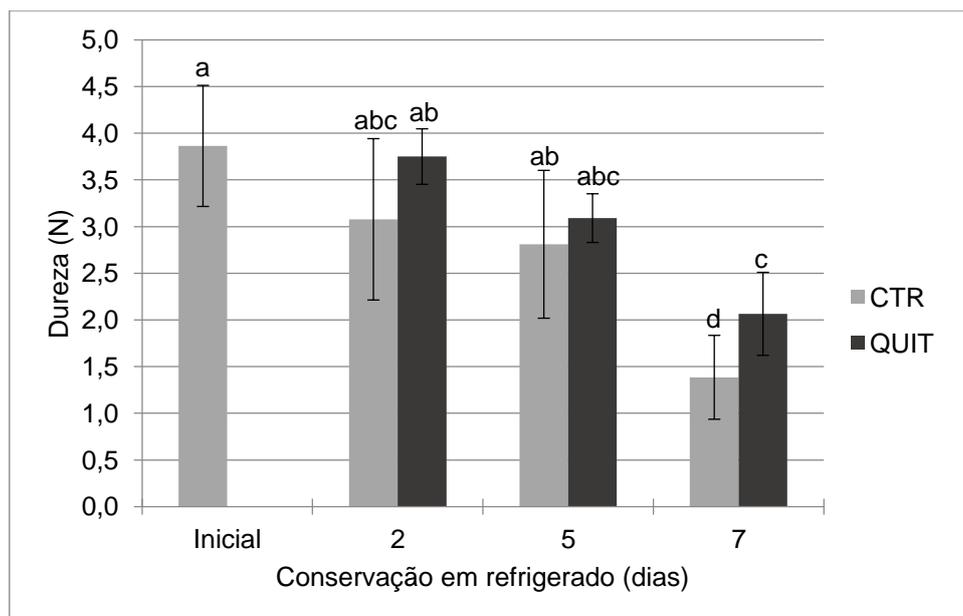


Figura 4.9. Evolução dos valores médios da dureza ($0,25 \leq DP \leq 0,79$) em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

4.2.2.5 Evolução da cor

A evolução dos diferentes parâmetros da cor medidos na parte ventral e dorsal dos filetes com e sem revestimento em função do tempo encontra-se no quadro 4.18 bem como na figura 4.10 onde se apresenta a evolução do índice de brancura.

Quadro 4.18. Evolução dos parâmetros de cor em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Zona do filete	Parâmetro	Ensaio	Inicial	Dias em refrigeração (dias)		
				2	5	7
Dorsal	L*	CTR	66,10±1,00 ^a	66,16±1,04 ^a	66,37±1,34 ^a	69,72±1,96 ^b
		QUIT		67,49±0,82 ^{ab}	69,38±2,18 ^b	69,91±1,74 ^b
	a*	CTR	4,65±1,36	3,86±1,01	4,60±0,97	4,36±0,87
		QUIT		4,72±1,05	3,75±1,28	3,84±0,64
	b*	CTR	5,40±0,55 ^a	4,98±0,62 ^{ab}	6,96±1,43 ^{bc}	10,90±1,82 ^d
		QUIT		4,75±0,82 ^{ab}	6,80±1,15 ^{abc}	7,65±1,21 ^c
	C*	CTR	7,18±1,24 ^{ab}	6,34±0,83 ^a	8,36±1,55 ^{ab}	11,78±1,68 ^c
		QUIT		6,79±0,42 ^{ab}	7,85±1,1 ^{ab}	8,61±0,86 ^{ac}

Quadro 4.18. (cont.) Evolução dos parâmetros de cor em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Ventral	L*	CTR	75,02±3,16	76,44±1,14	74,89±2,60	76,90±2,00
		QUIT		77,60±1,71	77,36±1,59	76,05±1,88
	a*	CTR	9,34±1,51 ^A	7,58±1,28 ^{AB}	7,85±1,64 ^{AB}	5,85±1,45 ^B
		QUIT		7,14±1,52 ^{AB}	6,77±0,91 ^{AB}	6,43±1,86 ^B
	b*	CTR	6,77±1,36 ^A	8,73±1,33 ^{AB}	12,72±2,71 ^{CD}	14,82±1,97 ^D
		QUIT		7,54±0,90 ^{AB}	8,89±1,49 ^{AB}	10,51±1,53 ^{BC}
	C	CTR	11,62±1,47 ^A	11,63±1,2 ^{AB}	15,06±2,42 ^{BC}	16,02±1,64 ^C
		QUIT		10,48±0,83 ^A	11,19±1,60 ^A	12,46±1,30 ^{AB}

Os resultados representam valores médios \pm desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração ($p < 0,05$). CTR – controle; QUIT – Quitosano.

No geral, os valores de L* e b* aumentaram durante a conservação em refrigerado. Os valores de luminosidade (L*) na parte ventral não registaram diferenças significativas desde o início até ao final da armazenagem em refrigerado em ambos os grupos. Todavia, no que respeita à parte dorsal do grupo QUIT o tempo de armazenagem influenciou significativamente ($P < 0,05$) os valores de L*, que passaram de um valor médio de 66,10 para 69,91 e afetou também os valores do CTR entre o quinto (66,37) e o sétimo dia (69,72). O aumento de luminosidade no grupo QUIT (parte dorsal) pode ser atribuído ao baixo pH da solução usada no revestimento, uma vez que a acidificação do músculo provoca uma ligeira desnaturação das proteínas sarcoplasmáticas que faz com que este pareça mais branco (L* superiores) e mais opaco. Para o parâmetro a* não foram registadas variações significativas na parte dorsal dos dois grupos (CTR e QUIT) durante a armazenagem em refrigerado, mas na parte ventral foi observada uma diminuição significativa quer no grupo CTR quer no QUIT. Segundo Wongwichian et al. (2015), esta evolução dos valores do parâmetro a* pode estar relacionada com a oxidação lipídica e a reação dos seus produtos de oxidação com grupos amina das proteínas e com a oxidação de alguma mioglobina que, na presença de oxigénio do ar, provoca a conversão em metamioglobina (cor castanha), contribuindo ambas para a perda da tonalidade avermelhada/rosada. Por seu lado, para o b* foram observados aumentos significativos na parte ventral e dorsal durante a conservação em refrigerado, contudo mais expressivos no grupo CTR, refletindo a intensificação de tons menos amarelados e mais acinzentados. Os valores do croma (C) aumentaram em ambas as zonas do filete durante a conservação em refrigerado dos dois grupos o que significa uma maior saturação das cores perceptíveis pelos consumidores.

Vários autores têm estudado as diferenças na cor de filetes de peixe com e sem revestimento de quitosano, todavia os resultados são muito disparees, não só porque a cor inicial dos filetes é muito variável de espécie para espécie, mas também porque as temperaturas de refrigeração e a fonte de quitosano e o grau de desacetilação são variáveis e parecem influenciar a cor (Hongpattarakere e Riyaphan, 2008). Todavia, Rezaabad et al. (2015) obteve resultados semelhantes aos deste estudo num peixe da família dos imperadores, mas, por exemplo, Küçükgülmez et al. (2013) não encontraram nenhum efeito da presença do quitosano na cor de filetes da enguia.

No que respeita ao índice de brancura (Fig. 4.10), verificou-se que a parte ventral dos filetes era mais branca do que a dorsal e que o revestimento com quitosano nessa parte não teve um efeito significativo. Quanto à parte dorsal observou-se um aumento significativo ao longo do tempo (no grupo QUIT), tal como esperado em função dos valores anteriormente discutidos.

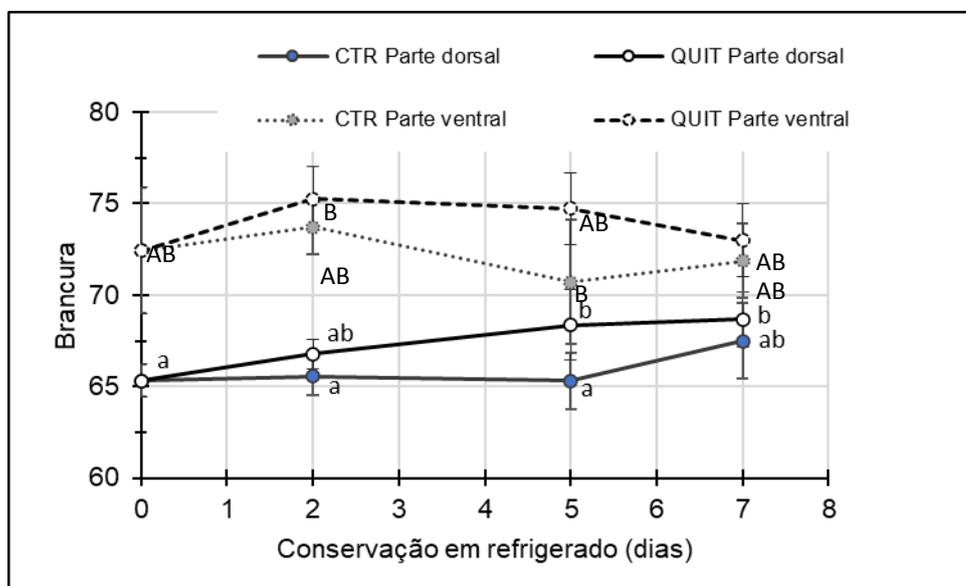


Figura 4.10. Evolução dos valores médios do índice de brancura ($0,82 \leq DP \leq 4,40$) em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

4.2.2.6 Evolução do exsudado

A quantidade de exsudado dá informação sobre a quantidade da água que se liberta durante a armazenagem em refrigerado. De acordo com os resultados do quadro 4.19 a percentagem de exsudado não se alterou significativamente ao longo do tempo quer no grupo CTR quer no QUIT. Todavia, os teores de exsudado foram significativamente superiores no grupo QUIT. Estes resultados são diferentes dos encontrados por outros autores (por exemplo Mohan et al., 2012; Farajzadeh et al., 2016), que reportam aumentos ao longo do tempo e superiores nas amostras não revestidas. A maior percentagem de exsudado no grupo QUIT talvez possa resultar de alguma aderência do quitosano ao absorvente incluído na embalagem.

Quadro 4.19. Evolução da percentagem de exsudado em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Ensaio	Exsudado (%)		
	Dias em refrigeração (dias)		
	2	5	7
CTR	0,92±0,19 ^a	0,83±0,19 ^a	1,07±0,37 ^a
QUIT	3,97±0,76 ^b	4,40±0,36 ^b	4,08±0,52 ^b

Os resultados representam valores médios \pm desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

4.2.2.7 Evolução sensorial

As evoluções dos atributos sensoriais selecionados, nos filetes com e sem revestimento em cru e em cozido, durante a conservação em refrigerado, encontram-se nos quadros 4.20 e 4.21, respetivamente. Como se pode observar, nos filetes em cru o cheiro característico dissipou-se muito rapidamente, não tendo sido já percebido ao segundo dia quer no grupo CTR quer no QUIT, por seu lado, a cor característica manteve-se até ao segundo dia e depois foi-se desvanecendo em função do tempo. Contrariamente, a perceção de cheiros alterados aumentou significativamente no decurso da conservação em refrigerado, embora menos intensamente nos filetes do grupo QUIT. O revestimento com quitosano teve um papel muito relevante na manutenção da cor como se pode observar através dos resultados da cor alterada. No quinto dia registaram-se notas intensas de fermentação que se acentuaram no sétimo dia. Nos filetes cozidos a prova na boca (sabor típico, sabor alterado, firmeza e suculência) foi efetuada apenas no início e no segundo dia, devido aos resultados microbiológicos (ver seção 4.2.2.8), não se registando diferenças significativas até ao segundo dia. Quanto aos cheiros característico e alterado, não se observaram alterações significativas nos filetes dos dois grupos até ao segundo dia de conservação em refrigerado a que seguiu uma alteração significativa, todavia menos acentuada nos filetes do grupo QUIT, como se pode observar no quadro 4.21.

Quadro 4.20. Evolução dos atributos sensoriais em cru em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Atributos sensoriais em cru	Ensaio	Inicial	Conservação em refrigerado (dias)		
			2	5	7
Cheiro característico	CTR	6,0±2,0 ^a	1,4±0,4 ^b	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^b
	QUIT		2,3±0,8 ^b	0,6±0,5 ^b	0,2±0,3 ^b
Cheiros alterados	CTR	0,0±0,0 ^a	3,9±1,1 ^b	6,2±0,8 ^{de}	7,4±0,5 ^d
	QUIT		2,0±0,1 ^c	3,9±0,1 ^{bc}	4,4±1,1 ^{be}

Quadro 4.20. (cont.) Evolução dos atributos sensoriais em cru em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Cor característica	CTR	6,0±0,0 ^a	4,4±1,3 ^{abc}	1,6±1,0 ^{cd}	0,4±0,7 ^d
	QUIT		5,1±0,3 ^{ab}	3,0±0,8 ^{bc}	1,5±0,7 ^{cd}
Cor alterada	CTR	1,0±1,0 ^a	1,6±0,4 ^{ab}	4,7±0,7 ^{bc}	5,7±1,6 ^c
	QUIT		0,3±0,6 ^a	2,7±0,7 ^{abc}	2,8±2,0 ^{abc}

Os resultados representam valores médios \pm desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

Quadro 4.21. Evolução dos atributos sensoriais em cozido em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Atributos sensoriais em cozido	Ensaio	Inicial	Conservação em refrigerado (dias)		
			2	5	7
Cheiro fresco típico	CTR	5,8±1,3 ^a	5,9±1,5 ^a	0,3±0,5 ^b	0,0±0,0 ^b
	QUIT		5,5±1,0 ^a	0,0±0,0 ^b	0,3±0,5 ^b
Cheiros alterados	CTR	0,3±0,5 ^a	1,3±1,5 ^a	6,0±0,8 ^{bc}	7,0±0,8 ^b
	QUIT		0,3±0,5 ^a	4,5±1,3 ^c	6,8±0,5 ^b
Sabor típico	CTR	6,8±1,0 ^a	4,5±1,7 ^a	nd	nd
	QUIT		6,3±0,5 ^a	nd	nd
Sabor alterado	CTR	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	nd	nd
	QUIT		0,3±0,5 ^a	nd	nd
Firmeza	CTR	6,3±1,26 ^a	3,5±1,0 ^a	nd	nd
	QUIT		4,8±1,7 ^a	nd	nd
Suculência	CTR	5,3±0,50 ^a	4,8±1,0 ^a	nd	nd
	QUIT		5,3±1,0 ^a	nd	nd

Os resultados representam valores médios \pm desvio padrão. nd- prova não realizada na boca. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

Muitos autores, por exemplo Ahmed et al. (2017) e Sun et al. (2018), verificaram uma extensão do tempo de vida útil de filetes de robalo e carpa revestidos com quitosano durante a conservação em refrigerado com base na avaliação sensorial, todavia, a manutenção dos atributos registou-se sobretudo na fase de qualidade aceitável (primeiros dois dias) e não no período inicial da conservação.

4.2.2.8 Evolução microbiológica

Normalmente, os alimentos frescos possuem uma população mista de microrganismos, incluindo diferentes espécies e estirpes de bactérias, fungos e leveduras, podendo algumas delas estar presentes em níveis mais elevados do que outras (Matthews et al., 2017). Os microrganismos (exceto os vírus), crescem e/ou multiplicam-se nos alimentos, de acordo com as suas características intrínsecas e as condições de armazenagem. A influência de cada fator sobre o crescimento microbiano não pode ser estudada de forma independente, pois todos eles estão interligados e influenciam a vários níveis (Matthews et al., 2017). Assim, apresentam-se no quadro 4.22 as mudanças na microbiota dos filetes CTR e QUIT ao longo do tempo de refrigeração através dos níveis de contagens totais (TVC), Enterobacterias, Pseudomonas e produtoras de H₂S. As contagens totais iniciais nos filetes de robalo indicam um valor médio de 4,38 log ufc/g, atingindo o valor máximo ao fim de 5 dias de conservação em refrigerado, respetivamente 9,46 e 9,10 log ufc/g para os grupos CTR e QUIT. As contagens de microrganismos viáveis totais revelaram valores superiores a 7 log ufc/g a partir do segundo dia de armazenagem, ultrapassando o limite de aceitabilidade estabelecido para este tipo de produtos alimentares pelo ICMSF (1986). Embora ao longo do tempo de refrigeração as contagens totais apresentem um aumento não linear, é possível verificar uma correlação positiva entre a carga microbiana e o tempo de conservação. As contagens iniciais de enterobactérias apresentam um valor médio de 2,39 log ufc/g, aumentando significativamente até ao quinto dia de armazenagem em refrigerado para 6,44 e 5,77 log ufc/g nos grupos CTR e QUIT, respetivamente.

Tabela 4.22. Evolução dos microrganismos em filetes sem e com revestimento de quitosano durante a conservação em refrigerado.

Microrganismos (log ufc/g)	Ensaio	Inicial	Conservação em refrigerado (dias)	
			2	5
TVC	CTR	4,38±0,55 ^a	8,76±0,04 ^{bc}	9,46±0,02 ^c
	QUIT		7,56±0,54 ^b	9,10±0,02 ^c
<i>Enterobacteriaceae</i>	CTR	2,39±0,26 ^a	4,86±0,20 ^c	6,44±0,06 ^d
	QUIT		3,69±0,02 ^c	5,77±0,18 ^d
<i>Pseudomonas</i>	CTR	4,13±0,59 ^a	8,54±0,11 ^{bc}	9,39±0,07 ^c
	QUIT		7,67±0,08 ^b	9,01±0,01 ^c
Produtoras de H ₂ S	CTR	3,59±0,02 ^a	8,11±0,10 ^c	9,03±0,01 ^d
	QUIT		7,23±0,35 ^b	8,96±0,02 ^d

Os resultados representam valores médios ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração (p<0,05). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

As contagens iniciais das *Pseudomonas* apresentaram um valor médio inicial de 4,13 log ufc/g, tendo sido registado um aumento de aproximadamente 4 log entre o início e o dia dois e de 1 log entre o

segundo e o quinto dia de conservação em refrigerado. O género *Pseudomonas* é constituído por microrganismos psicrófilos responsáveis por perdas económicas significativas, pelo facto de serem bactérias importantes na degradação do pescado armazenado sob condições de refrigeração. As *Pseudomonas* juntamente com microrganismos da espécie *Shewanella putrefaciens* fazem parte da microbiota degradativa específica de peixes de águas temperadas. No que respeita à evolução das bactérias sulfito redutoras, verificou-se uma evolução muito acentuada ao longo da conservação em refrigerado até ao quinto dia.

Um elevado número de autores (por exemplo, Jeon et al., 2002; Pereda et al., 2011, Günlü e Koyun, 2013; Rezaabad et al., 2017) referem que o revestimento com quitosano diminui a atividade microbiana pelo facto de este poder absorver nutrientes usados pelas bactérias e também por inibir vários sistemas enzimáticos e bacterianos. O efeito antimicrobiano do quitosano tem sido também atribuído à interação de grupos NH_3^+ com moléculas de carga negativa presentes à superfície das células microbianas, provocando roturas, sobretudo das membranas das bactérias gram negativas (Pereda et al., 2011), e ao seu efeito barreira em relação ao oxigénio (Jeon et al., 2002). Günlü e Koyun (2013) verificaram que, em filetes de robalo revestidos com quitosano, embalados sob vácuo e armazenados em refrigerado, as contagens totais foram significativamente inferiores às dos filetes sem revestimento. Todavia, no presente não se observou um efeito significativo do revestimento com quitosano, uma vez que apenas se verificaram ligeiras diminuições. Mais uma vez importa ter em conta que o efeito do quitosano depende de vários fatores tais como grau de frescura da matéria prima, grau de desacetilação, pH do meio, temperatura e principais constituintes dos alimentos (Hongpattarakere e Riyaphan, 2008).

4.2.3 Conservação em congelado de filetes de robalo revestidos com quitosano

4.2.3.1 Retenção da água de vidragem e do revestimento e composição química do robalo

Neste estudo, usaram-se robalos ($n=60$) da gama 600-700 g. A massa média dos filetes foi $312,5 \pm 26,5$ g e o rendimento médio na filetagem foi de $42,8 \pm 3,6\%$.

Como referido no capítulo 3 (Material e Métodos) os filetes foram vidrados em ambiente industrial em água à temperatura de 4°C e vidrados com a solução de quitosano à temperatura ambiente. A retenção média da água de vidragem e do revestimento de quitosano foi de $10,07 \pm 3,37$ e $21,81 \pm 2,55\%$, respetivamente. No que respeita à retenção da água de vidragem, o valor é da mesma ordem de grandeza dos valores médios registados na GELPEIXE para diferentes produtos congelados à base de pescado (comunicação pessoal). Quanto ao valor médio da retenção da solução de quitosano, constata-se que é muito superior ao referida na figura 4.7, considerando-se que este facto decorre dos filetes ao serem imersos se encontrarem a uma temperatura ao redor de -30°C o que leva a um arrefecimento da solução de quitosano, levando a um aumento da sua viscosidade que se traduz numa maior aderência e retenção. Segundo Sathivel et al. (2007), a viscosidade aparente de soluções de quitosano a 1% varia entre 0,056 e 0,074 P/s quando a

temperatura passa de 20 para 10 °C. O aspecto dos filetes CTR e QUIT embalados e antes e após a determinação da água de vidragem encontra-se na figura 4.11.

A composição química dos filetes de robalo de aquacultura usados encontra-se no quadro 4.23. Os valores são ligeiramente diferentes dos referidos anteriormente para o robalo usados nos ensaios de refrigeração, mas o calibre e a proveniência eram diferentes.



Figura 4.11. Aspecto dos filetes controlo (a, c, e) e revestidos (b, d, e) na embalagem (a, b), antes da determinação da água de vidragem (c, d) e após determinação da água de vidragem (e, f) (após 3 meses de armazenagem em congelado). CTR – controlo; QUIT – Quitossano.

4.2.3.2 Evolução da composição química aproximada

Como se pode observar no quadro 4.23 não houve efeito significativo ($P > 0,05$) do tempo de armazenagem em congelado nos quatro constituintes nos filetes de robalo com e sem revestimento. Alguns autores (por exemplo Emire e Gebremariam, 2010) reportam a ocorrência de alterações significativas na composição química ao fim de dois meses, sobretudo uma diminuição no teor em água em filetes de tilápia, mas a maioria refere que alterações notórias ao longo da armazenagem em congelado nestes quatro constituintes ocorrem principalmente quando há desidratação dos filetes devido a abusos de temperatura que conduzem à sublimação da água (ficando sob a forma de vapor) para a embalagem, traduzindo-se na presença de cristais de gelo.

Quadro 4.23. Composição química aproximada da parte edível do robalo e dos filetes e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.

Composição química aproximada (g/100 g)	Ensaio	Matéria-prima	Conservação em congelado (meses)		
			0	6	14
Humidade	CTR	74,24±1,09	71,35±3,98	73,53±0,05	72,58±2,89
	QUIT		73,04±1,45	72,12±3,33	72,41±1,65
Proteína	CTR	19,19±1,08	19,29±0,77	19,68±0,03	18,71±0,39
	QUIT		18,76±0,56	18,82±0,49	19,20±0,21
Gordura	CTR	4,87±0,32	6,01±1,10	5,28±0,21	5,59±0,33
	QUIT		5,59±0,21	6,05±0,97	5,86±0,17
Cinza	CTR	1,2±0,09	1,03±0,07	1,01±0,27	1,19±0,05
	QUIT		1,17±0,07	1,13±0,05	1,09±0,08

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas entre ensaios e período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

4.2.3.3 Evolução da água de vidragem e do revestimento

A vidragem é uma operação fundamental na conservação de produtos da pesca congelados. De acordo com o decreto lei nº 37/2004 (<https://dre.pt/application/conteudo/568933>), a água de vidragem é a quantidade de água para consumo humano, contendo ou não aditivos autorizados, aplicada por imersão ou pulverização, de modo a formar uma camada de gelo à superfície do produto congelado e ultracongelado, desde que o líquido seja apenas acessório em relação aos elementos essenciais do preparado e, por conseguinte, não seja decisivo para a compra. Segundo Nunes e Batista (1991) a quantidade de água de vidragem pode oscilar entre 2 e 20% de acordo com as características do produto, período de armazenagem pretendido e variáveis operacionais da armazenagem em congelado. Nestes ensaios usou-se a metodologia industrial que é praticada na empresa em que o processo foi efetuado. A percentagem da água de vidragem ao longo dos 14 meses foi constante (entre 11,11 e 13,93%), o que indica que o produto estava bem protegido e que as condições de armazenagem eram estáveis (Quadro 4.24). No que respeita aos filetes revestidos com quitosano verificou-se que as perdas de peso determinadas nas mesmas condições da água de vidragem diminuíram significativamente ao longo do tempo, certamente devido a modificações físicas da estrutura do revestimento de quitosano. Resultados semelhantes foram obtidos por Soares et al. (2015) em filetes de salmão revestidos com diferentes soluções de quitosano. Também segundo Sathivel et al. (2007), as perdas de massa durante a descongelação de filetes de salmão sem pele revestidos com soluções de quitosano foram sempre inferiores às registadas em filetes vidrados com água ou com soluções de ácido láctico e também diminuíram em função do tempo de armazenagem devido a alterações na viscosidade. Este aspeto pode visualizar-se na figura 4.12, que evidencia a presença de revestimento após a determinação da água de vidragem. Os resultados obtidos sugerem a sublimação da água do revestimento ou a absorção de alguma água pelo próprio

quitosano, mas até doze meses de armazenagem ainda existe uma percentagem de revestimento suficiente para evitar a desidratação da superfície dos filetes.

Quadro 4.24. Evolução do teor de água de vidragem e de revestimento ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Água de vidragem e revestimento (g/100 g produto congelado)	
	CTR	QUIT
0	11,11±1,35 ^a	5,41±1,86 ^b
3	12,62±2,61 ^a	4,48±1,20 ^{bc}
6	12,24±1,06 ^a	3,74±1,40 ^{bc}
9	11,66±1,50 ^a	5,45±0,54 ^b
12	13,93±0,82 ^a	2,32±1,09 ^{bc}
14	12,80±2,35 ^a	0,71±0,19 ^c

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.



Figura 4.12. Aspeto da pele do filete revestido após determinação da água de vidragem.

4.2.3.4 Evolução da capacidade de retenção da água (WHC)

No caso dos filetes de peixe a capacidade de retenção da água pode ser entendida como a aptidão para reter a água de constituição durante o processamento, tratamento térmico, transporte e armazenagem. Durante a armazenagem do pescado ocorrem várias alterações, sendo os efeitos da desnaturação proteica muito marcantes, pois induzem a redução da solubilidade das proteínas que se podem manifestar por diminuição da capacidade de retenção da água bem como na formação de exsudados. As alterações na capacidade de retenção de água das fibras musculares do pescado podem resultar do seu afastamento ou compressão devido ao gelo que se forma entre elas; alterações estas que as tornam incapazes, no momento da descongelação, de voltar a absorver a água que perderam no processo de congelação, o que as impede de recuperar o volume inicial. No quadro 4.25 apresenta-se a evolução da capacidade de retenção da água nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado. No grupo CTR verificou-se uma ligeira diminuição a partir do sexto mês de armazenagem em congelado enquanto que no grupo QUIT a

principal diminuição só se observou no final do período de armazenagem (mês 14). Estes resultados permitem concluir que nos dois grupos de filetes, a desnaturação da proteína foi pouco acentuada durante a armazenagem em congelado, podendo tal facto ser resultado do elevado grau de à frescura da matéria prima usada nestes ensaios. Os menores valores registados no grupo QUIT podem ser atribuídos à libertação da água do revestimento durante a centrifugação, facto que contribuiu para aumentar a quantidade libertada. A evolução da WHC tem sido estudada por vários autores em diferentes espécies, por exemplo pescada (Sánchez-Alonso et al., 2012), salmão (Fernández-Segovia et al., 2012) e robalo (Tironi et al. 2010) e os diferentes autores são unânimes em considerar que as características intrínsecas da espécie, o grau de frescura da matéria prima e o tipo de congelação são fatores influenciadores da capacidade de retenção da água durante a armazenagem em congelado. O efeito do revestimento de quitosano na WHC dos filetes de robalo foi menor do que a referida por Soares et al. (2015) em filetes de salmão revestidos com diferentes soluções de quitosano.

Quadro 4.25. Evolução da capacidade de retenção da água nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Capacidade de retenção da água	
	CTR	QUIT
0	56,41±3,27 ^a	53,93±4,63 ^{ab}
3	55,79±4,34 ^a	54,60±2,84 ^{ab}
6	54,13±3,26 ^{ab}	52,63±2,18 ^{ab}
9	50,80±1,74 ^{ab}	52,15±4,63 ^{ab}
12	53,07±2,05 ^{ab}	50,30±4,59 ^{ab}
14	51,26±3,22 ^{ab}	47,49±2,65 ^b

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

4.2.3.5 Evolução da textura

A textura é uma característica muito importante nos filetes de peixe, que pode ficar prejudicada pela armazenagem em congelado. Esta alteração é, em grande parte, devida à diminuição da capacidade de retenção da água que dá origem ao aparecimento de uma textura seca e dura no pescado armazenado em congelado após descongelação.

Como se pode observar na figura 4.13 a evolução da dureza dos filetes CTR e QUIT não exibiu um padrão bem definido ao longo do tempo de conservação em congelado e, por outro lado, o papel do revestimento também não foi notório. Cao et al., (2020), verificaram diminuições da dureza ao longo do tempo quer nos filetes controlo quer nos revestidos com soluções de 2% de quitosano em filetes da espécie *Monopterus albus*, enquanto que Soares et al. (2015) observaram um efeito positivo na

manutenção da textura de filetes de salmão durante a armazenagem em congelado. Os resultados obtidos para a textura dos filetes de robalo neste estudo estão em consonância com os resultados observados para a capacidade de retenção da água.

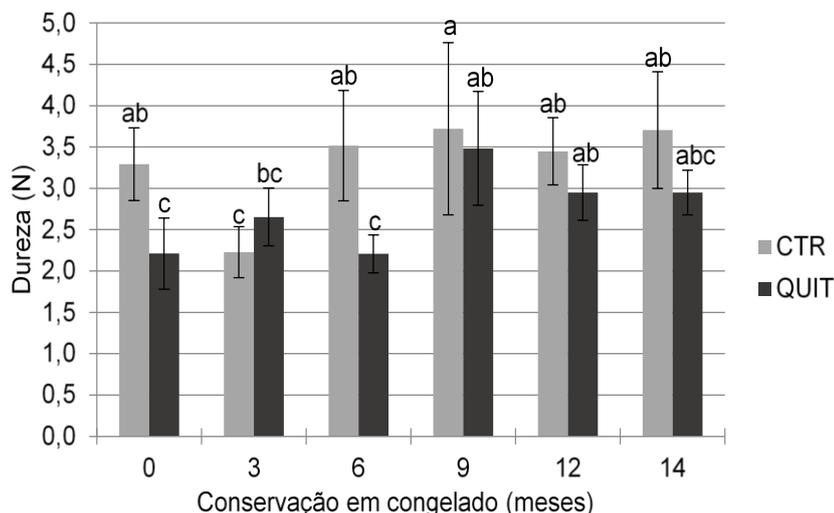


Figura 4.13. Evolução da textura nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão ($0,23 \leq DP \leq 1,04$). Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controle; QUIT – Quitossano.

4.2.3.6 Evolução da cor

A evolução dos diferentes parâmetros da cor instrumental medidos na parte dorsal e ventral dos filetes com e sem revestimento em função do tempo de armazenagem em congelado encontra-se no quadro 4.26 e 4.27, respetivamente, bem como na figura 4.14 onde se apresenta a evolução do índice de brancura. Na zona dorsal dos filetes QUIT verificaram-se valores de luminosidade ligeiramente superiores aos dos filetes CTR. Tal como referido em 4.2.2.5 esta ligeira diferença deve-se ao pH da solução de revestimento. Estes valores são diferentes dos obtidos em filetes de tilápia (Held, 2019) em que o autor verificou um aumento significativo quer nos filetes controlo que nos filetes com revestimentos com diferentes concentrações de quitossano (0,75; 1,50 e 2,25%). Relativamente a a^* , os dois grupos de filetes apresentaram resultados bastante idênticos, não se verificando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre eles. Acresce também que os valores do parâmetro a^* não foram influenciados pela duração da armazenagem em congelado. Por seu lado os valores do parâmetro b^* aumentaram significativamente ao longo do tempo nos filetes CTR e QUIT. A evolução dos valores de L^* nos filetes de robalo deste estudo foi ligeiramente diferente da observada por Tironi et al. (2010) também para filetes de robalo, pois estes autores verificaram um aumento significativo após o primeiro mês de armazenagem em congelado, mas no que respeita aos

valores de a* e de b* o comportamento foi idêntico. O aumento de b* (indicando a intensificação da coloração amarelada), é muitas vezes observada nos filetes congelados de peixe devido à presença de pigmentos amarelados resultantes da oxidação dos lípidos e à ocorrência de outras reações químicas e enzimáticas que conferem colorações amareladas e/ou acastanhadas, causando um escurecimento muscular (Nakazawa e Okazaki, 2020). Em relação à saturação da cor (croma) dos filetes CTR e QUIT, verificou-se um aumento significativo em resultado dos valores do parâmetro b*. Relativamente à cor da zona ventral dos filetes de robalo CTR e QUIT armazenados em congelado, não foram observadas diferenças significativas induzidas pela presença de revestimento ou pelo tempo de armazenagem em congelado (Quadro 4.25).

Finalmente, em relação à brancura, verificou-se que a parte ventral exibiu uma maior intensidade de brancura (>70), mas o revestimento com quitosano não afetou este parâmetro (Figura 4.12).

Quadro 4.26. Evolução dos parâmetros da cor na zona dorsal nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Tratamento	Parâmetros da cor na zona dorsal do filete			
		L*	a*	b*	C*
0	CTR	68,55±2,07 ^a	4,10±0,92	7,83±0,26 ^{ab}	8,87±0,53 ^{ab}
	QUIT	70,32±1,71 ^{ab}	4,44±1,31	7,19±1,25 ^a	8,49±1,57 ^a
3	CTR	71,27±2,55 ^{ab}	3,59±0,87	9,49±0,81 ^{bc}	10,18±0,79 ^{abc}
	QUIT	71,40±2,51 ^{ab}	3,76±1,16	9,55±0,72 ^c	10,30±0,85 ^{abc}
6	CTR	69,62±0,76 ^{ab}	3,11±1,13	10,09±1,08 ^{cd}	10,61±0,98 ^{abcd}
	QUIT	71,00±2,72 ^{ab}	2,62±1,42	9,92±1,00 ^{cd}	10,34±0,97 ^{abc}
9	CTR	68,85±1,71 ^{ab}	3,99±1,43	10,19±0,85 ^{cd}	10,99±1,19 ^{bcd}
	QUIT	71,30±3,17 ^{ab}	3,29±0,98	10,25±0,80 ^{cd}	10,79±0,87 ^{bcd}
12	CTR	71,47±1,70 ^{ab}	3,03±1,44	10,59±1,71 ^{cd}	11,05±2,01 ^{cd}
	QUIT	74,11±4,19 ^b	2,93±1,37	10,87±0,84 ^{cd}	11,33±0,69 ^{cd}
14	CTR	70,73±3,39 ^{ab}	3,79±1,42	11,21±1,20 ^{cd}	11,93±0,84 ^{cd}
	QUIT	72,05±3,95 ^{ab}	4,82±1,51	11,54±0,85 ^d	12,57±0,97 ^d

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação (p<0,05). CTR – controlo; QUIT – Quitosano.

Quadro 4.27. Evolução dos parâmetros da cor na zona ventral nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Tratamento	Parâmetros da cor na zona ventral do filete			
		L*	a*	b*	C
0	CTR	77,94±5,98	6,40±2,99	10,87±1,79	12,80±2,51
	QUIT	74,67±3,04	5,77±0,95	9,68±1,39	11,32±1,25
3	CTR	76,28±1,75	6,64±2,89	9,71±1,38	11,95±2,20
	QUIT	75,92±1,96	5,01±1,38	11,63±1,40	12,73±1,35
6	CTR	76,90±3,21	6,40±1,70	10,53±1,16	12,39±1,40
	QUIT	75,79±3,87	5,19±2,41	11,12±0,98	12,38±1,89
9	CTR	75,02±2,11	6,35±1,98	12,01±1,25	13,66±1,73
	QUIT	76,74±2,31	5,36±0,95	11,55±0,69	12,77±0,56
12	CTR	76,36±5,78	5,49±1,67	11,85±0,93	13,13±1,21
	QUIT	73,07±2,60	5,51±1,68	11,82±1,28	13,08±1,77
14	CTR	79,27±3,66	4,51±1,85	11,68±1,63	12,58±2,08
	QUIT	76,13±3,58	5,40±1,59	11,81±1,15	13,02±1,57

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação (p<0,05). CTR – controle; QUIT – Quitosano.

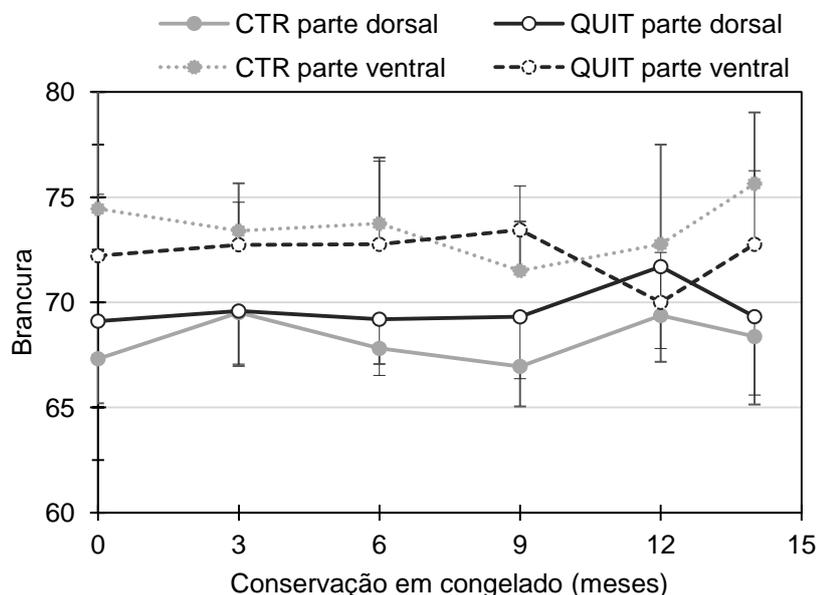


Figura 4.14 Evolução da brancura nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado. Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão (zona dorsal: 0,74≤DP≤3,86 e zona ventral: 2,02≤DP≤6,25). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e período de refrigeração (p<0,05). CTR – controle; QUIT – Quitosano.

4.2.3.7 *Evolução sensorial*

As evoluções dos atributos sensoriais em cozido nos filetes com e sem revestimento, durante a conservação em congelado ao longo de catorze meses, encontram-se nos quadros 4.28 (cheiro e cor) e 4.29 (sabor e textura: firmeza e suculência). Como se pode observar, os provadores não detetaram diferenças significativas nos diferentes atributos sensoriais, embora alguns tenham indicado ligeiras notas de oxidação ao nível do cheiro alterado a partir do nono mês de conservação em congelado. Os resultados indicam também que o revestimento dos filetes de robalo com quitosano não influenciou negativamente os atributos sensoriais das amostras congeladas, descongeladas e cozidas.

No que respeita ao cheiro típico e alterado e à cor os valores observados revelam a heterogeneidade das amostras, sendo interessante observar ter havido um ligeiro desvanecimento do cheiro típico logo após a congelação. Os valores da textura (firmeza) estão concordantes com os obtidos na textura instrumental. Com base na mini revisão efetuada por Duarte et al. (2010), que aborda os resultados em várias espécies selvagens e de aquacultura, pode concluir-se que quando os filetes são preparados a partir de peixe muito fresco, processados com rapidez e embalados em condições adequadas, as alterações sensoriais são lentas o que permite atingir tempos de vida útil ao redor de doze meses. Na maior parte dos estudos referidos nesta mini revisão o desaparecimento do cheiro típico foi o aspeto mais referenciado. Soares et al. (2017) verificaram a não existência de diferenças significativas entre as amostras controlo (vidradas com água) e vidradas com revestimentos de quitosano (10 s e soluções de quitosano a 1,5%) nos dois primeiros meses de armazenagem em congelado aos quais se seguiram diferenças significativas no flavor e no aspeto. Piedrahíta Márquez et al. (2019) também obtiveram bons resultados sensoriais em filetes de cachama (*Piaractus brachypomus*) revestidos com quitosano e própolis (uma substância natural, de características resinosas, produzida pelas abelhas).

Quadro 4.28. Evolução dos atributos sensoriais cheiro e cor em cozido nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Tratamento	Atributos sensoriais em cozido - cheiro e cor		
		Cheiro típico	Cheiro alterado	Cor típica
0	CTR	4,7±2,0	0,0±0,0	5,8±1,0
	QUIT	5,4±0,8	0,6±1,2	6,2±0,7
3	CTR	4,7±0,9	0,3±0,5	4,6±1,1
	QUIT	4,7±1,0	0,8±1,2	4,2±0,8
6	CTR	5,2±1,3	0,3±0,8	5,3±1,0
	QUIT	4,7±1,8	1,2±1,8	4,3±2,1
9	CTR	4,8±1,3	0,3±0,8	4,3±1,4
	QUIT	4,2±1,7	0,8±2,0	3,8±1,2
12	CTR	5,0±2,1	0,8±2,0	3,8±1,8
	QUIT	4,8±2,3	1,0±1,5	5,2±1,0
14	CTR	5,0±1,4	0,6±1,3	4,5±1,5
	QUIT	5,0±2,0	1,0±2,2	4,7±2,1

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controle; QUIT – Quitosano.

Quadro 4.29. Evolução dos atributos sensoriais sabor, firmeza e suculência em cozido nos filetes com e sem revestimento ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Tratamento	Atributos sensoriais em cozido - prova na boca			
		Sabor típico	Sabor alterado	Firmeza	Suculência
0	CTR	6,0±1,3	0,3±0,6	6,0±0,9	4,0±0,6
	QUIT	6,1±0,7	0,3±0,5	5,3±1,4	4,3±1,0
3	CTR	5,2±1,0	0,3±0,5	5,1±0,7	3,3±1,0
	QUIT	4,5±1,0	0,7±0,6	5,0±0,9	3,7±0,9
6	CTR	5,3±1,2	0,3±0,5	6,3±1,0	4,5±0,5
	QUIT	4,8±1,3	0,2±0,4	5,8±1,5	3,8±1,6
9	CTR	4,5±0,6	0,5±0,9	5,3±0,8	3,3±1,4
	QUIT	4,5±1,7	0,6±1,0	4,7±1,5	3,3±1,0
12	CTR	4,0±2,3	1,5±1,3	6,0±1,3	3,8±1,7
	QUIT	3,8±1,0	1,7±1,5	5,8±1,2	3,5±1,0
14	CTR	4,3±1,0	0,8±1,0	5,5±1,5	3,8±1,2
	QUIT	4,8±1,3	1,2±1,3	4,8±1,3	3,7±1,9

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controle; QUIT – Quitosano.

4.2.3.8 Evolução microbiológica

A evolução dos níveis de contagens totais (TVC) e enterobactérias nos filetes CTR e QUIT ao longo da armazenagem em congelado apresentam-se no quadro 4.30. As contagens iniciais nos filetes de robalo foram respetivamente 2,05 e 3,67 log ufc/g para as enterobactérias e contagens totais. Relativamente às *Enterobacteriaceas*, ocorreu uma ligeira diminuição devido à congelação e durante a armazenagem em congelado não foi observada nenhuma diminuição significativa. Após o terceiro mês verificou-se uma diminuição significativa nas contagens totais dos filetes QUIT enquanto que nos filetes CTR essa significativa diminuição não foi registada. Os valores de TVC foram sempre muito inferiores aos valores limite indicados para pescado congelado de boa qualidade (5X10⁵ CFU/g) pelo ICMSF (1986).

Alguns autores (por exemplo, Jeon et al., 2002; Fan et al., 2009, Pereda et al., 2011, Günlü e Koyun, 2013; Rezaabad et al., 2017) referem que o revestimento com quitosano diminui a atividade microbiana pelo facto de este poder absorver nutrientes usados pelas bactérias e também por inibir vários sistemas enzimáticos.

Quadro 4.30. Evolução dos microrganismos em filetes sem e com revestimento de quitosano ao longo da conservação em congelado.

Tempo em congelado (meses)	Tratamento	<i>Enterobacteriaceas</i> (Log CFU/g)	TVC (Log CFU/g)
0	Matéria-prima	2,05±0,14	3,67±0,05
	CTR	1,54±0,09	2,73±0,06 ^a
	QUIT	< 1,0 *	2,74±0,06 ^a
3	CTR	1,30±0,00	2,74±0,18 ^a
	QUIT	< 1,0 *	1,54±0,09 ^b
14	CTR	< 1,0 *	2,42±0,08 ^a
	QUIT	< 1,0 *	1,00±0,00 ^c

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de congelação ($p < 0,05$). CTR – controlo; QUIT – Quitosano. * Limite de quantificação. Os valores da matéria prima não foram considerados no tratamento estatístico.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

O processo industrial de cozedura sem adição de sal usado neste trabalho revelou-se muito adequado na obtenção de um produto conveniente à base de polvo comum da costa portuguesa e do caldo de cozedura, ambos com elevado potencial de aplicação na confeção culinária de vários pratos quer da gastronomia nacional quer internacional. O processo permitiu elevadas retenções dos macro e micronutrientes, destacando-se, de entre os principais constituintes, as da proteína e dos lípidos, respetivamente 78,8 e 89,5%. Verificou-se também uma concentração significativa de todos os ácidos gordos e a manutenção de um perfil idêntico ao do polvo cru. Os níveis de retenção foram cerca de 89, 90 e 92%, respetivamente para os PUFA, SFA e MUFA e no que respeita ao EPA e DHA as foram cerca de 90%. De um modo geral, confirmou-se uma elevada taxa de retenção dos aminoácidos, com valores que variaram entre 99% para a lisina e 43% para a taurina. As taxas de retenção do sódio e o potássio foram inferiores a 50% e as do selénio e do iodo foram respetivamente 54 e 87%, destacando-se, assim, o baixo teor em sódio no produto cozido e a importante retenção do iodo. No que respeita aos elementos tóxicos, a retenção não coloca nenhum problema pelo facto dos valores encontrados serem muito inferiores aos limites regulamentados.

No que respeita à contribuição nutricional, os resultados obtidos permitem concluir que o polvo cozido pode ser classificado como um produto alimentar rico em proteínas de elevado valor biológico, pois para além de fornecerem mais de 20% do valor energético, os scores da quase totalidade dos aminoácidos essenciais eram superiores a 100%. Por outro lado, o consumo de uma porção de 150 g contribui para a ingestão diária recomendada de nutrientes benéficos para a saúde, tais como os ácidos gordos EPA e DHA (contribuição nutricional superior a 100%).

No polvo armazenado em congelado verificaram-se algumas alterações ligeiras, que são usuais neste tipo de produtos, como diminuições dos teores de água e proteína, resultantes de alguma desidratação e desnaturação proteica. No que respeita aos ácidos gordos, observou-se a manutenção do perfil de abundância dos três grupos de ácidos gordos, isto é, PUFA>SFA>MUFA. Quanto aos aminoácidos verificou-se que a armazenagem em congelado nas condições usadas não afetou o perfil quer dos essenciais quer dos não essenciais. Relativamente aos minerais, é de salientar a diminuição usual dos teores de potássio em congelado e a estabilidade dos restantes, nomeadamente do iodo e do selénio. A contribuição nutricional do polvo armazenado em congelado no que respeita aos teores de EPA e DHA e de minerais não alterou os scores dos aminoácidos essenciais.

Os resultados da textura, que é sempre um parâmetro crítico no pescado congelado, evidenciaram que o polvo cozido, previamente amaciado por congelação, armazenado em congelado por um período de oito meses era um produto muito estável. Sob o ponto de vista microbiológico e sensorial observou-se também uma grande estabilidade, sendo de referir a manutenção do sabor e cor típicos bem como a suculência, atributos muito importantes para a aceitação dos consumidores, bem como o não desenvolvimento de cor, sabor e cheiro alterados. O caldo de cozedura do polvo armazenado em congelado, em termos de composição química, atributos sensoriais e evolução microbiológica, não apresentou alterações significativas, sendo, no entanto, de referir algum escurecimento ao longo do tempo.

Estes resultados permitiram responder aos dois primeiros objetivos propostos, sendo de concluir que o polvo comum cozido da costa portuguesa e conservado nas condições indicadas é um produto estável (tempo de vida útil de pelo menos oito meses em congelado) e com elevado valor nutricional que o tornam muito apelativo quer para as confeções alimentares tradicionais quer para preparações mais elaboradas.

Os ensaios de seleção do revestimento com base na literatura (iota carragenato ou quitosano) para aplicar em filetes de robalo evidenciaram que soluções de quitosano a 1,0% e tempos de imersão de 10 segundos proporcionavam uma melhor aderência, aspeto uniforme, ausência de cheiro e um revestimento homogéneo em comparação com os do iota carragenato, deixando os filetes idênticos aos sem revestimento. Estas condições foram usadas nos ensaios posteriores de refrigeração e congelação.

O revestimento com quitosano não afetou de modo relevante a composição química dos filetes conservados em refrigerado durante sete dias, mas, teve um efeito positivo na diminuição da acumulação dos teores de compostos azotados básicos, incluindo o azoto de trimetilamina, ao longo do tempo. No que respeita à textura os resultados obtidos permitem concluir que a presença do quitosano retardou a degradação, sobretudo numa fase mais avançada da conservação. A cor da parte dorsal dos filetes revestidos com quitosano evidenciou valores mais elevados de L^* e de b^* e um valor de intensidade de cor menos acentuado do que os filetes CTR ao longo do tempo de refrigeração. Os atributos sensoriais dos filetes QUIT não foram prejudicados pelo revestimento, mas o seu efeito benéfico não foi tão significativo como o referido na literatura por muitos autores. De igual modo também não se observou no presente trabalho um efeito significativo do revestimento com quitosano na atividade microbiana, uma vez que apenas se verificaram ligeiras diminuições.

A composição química dos filetes com e sem revestimento ao longo dos 14 meses de armazenagem em congelado não exibiu alterações significativa. O teor da água de vidragem foi constante, mas o teor de revestimento (calculado nas mesmas condições da água de vidragem) diminuiu significativamente, sugerindo os resultados alguma sublimação da água do

revestimento, todavia até doze meses de armazenagem ainda existia uma quantidade de revestimento suficiente para evitar a desidratação superficial dos filetes. A presença do revestimento de quitosano teve um efeito positivo na capacidade de retenção da água, pois no grupo CTR verificou-se uma ligeira diminuição a partir do sexto mês de armazenagem enquanto que no grupo QUIT a principal diminuição só se observou no final do período de armazenagem (mês 14). A evolução da dureza dos filetes CTR e QUIT não exibiu um padrão bem definido ao longo do tempo de conservação em congelado, não tendo sido possível encontrar algum efeito do revestimento com quitosano. Tal como observado nos filetes conservados em refrigerado, também nos conservados em congelado, observaram-se valores de luminosidade ligeiramente superiores nos filetes QUIT em relação aos CTR. Relativamente ao parâmetro a^* , os dois grupos de filetes apresentaram resultados bastante idênticos, não se verificando diferenças significativas entre eles nem durante a armazenagem em congelado. Por seu lado os valores do parâmetro b^* aumentaram significativamente ao longo do tempo nos filetes CTR e QUIT. Em relação à saturação da cor dos filetes verificou-se um aumento significativo nos filetes de ambos os tratamentos ao longo do tempo. Quanto aos atributos sensoriais, não foram detetadas diferenças significativas nos diferentes atributos sensoriais, embora alguns provadores tenham detetado ligeiras notas de oxidação ao nível do cheiro alterado a partir do nono mês de conservação em congelado. Os resultados indicam também que o revestimento dos filetes de robalo com quitosano não influenciou negativamente os atributos sensoriais das amostras congeladas, descongeladas e cozidas. Por último, verificou-se uma diminuição significativa nas contagens totais dos filetes QUIT enquanto que nos filetes CTR essa significativa diminuição não foi registada e quanto às enterobacteriaceas, ocorreu uma ligeira diminuição devido à congelação e durante a armazenagem em congelado, mas não foi observada nenhuma diminuição significativa.

Estes resultados permitem responder a algumas questões implícitas nos objetivos três e quatro. Todavia, contrariamente ao que muitos artigos da especialidade referem o revestimento com quitosano não permitiu prolongar significativamente o tempo de vida útil dos filetes revestidos em refrigerado. Quanto aos filetes congelados parece haver um maior potencial para a utilização dos revestimentos à base de quitosano, tanto mais que a substituição da água de vidragem por revestimentos com soluções de quitosano poderá contribuir para gastar menores quantidade de água e de energia associadas à operação de vidragem, aspeto que poderá vir a ser tema de trabalhos futuros dado o forte impacto ambiental desta operação.

Finalmente, importa ter em conta que o efeito do quitosano depende de vários fatores tais como grau de frescura da matéria prima, grau de desacetilação que é muito variável conforme a fonte e processo tecnológico da sua obtenção, pH do meio, temperatura e principais constituintes dos alimentos, propondo-se assim como trabalho futuro a realização de estudos sobre o efeito destes fatores na conservação dos produtos da pesca e aquacultura. Embora tenha sido objetivo deste trabalho não utilizar o revestimento como transporte de compostos bioativos e antimicrobianos, considera-se que esta área poderá ser igualmente considerada em trabalhos futuros.

Estas conclusões permitem sugerir alguns temas para trabalho futuro, destacando-se: (i) Avaliar o interesse de tecnologias ambientalmente mais amigáveis, como aquecimento óhmico, alta pressão hidrostática, radiofrequência e pulsos elétricos, na cozedura industrial do polvo (sem adição de sal) para reduzir o tempo de cozedura e gastos de energia e água e (ii) Estudar o efeito da incorporação de compostos funcionais, tais como péptidos (ex. nisina e ciatimina), extratos vegetais (orégãos, rosmaninho, pimento, chá, e alho, entre outros), antioxidantes e agentes antimicrobianos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ablikim, B., Liu, Y., Kerim, A., Shen, P., Abdurerim, P., Zhou, G.H., 2016. Effects of breed, muscle type, and frozen storage on physico-chemical characteristics of lamb meat and its relationship with tenderness. *CyTA-Journal of Food*, 14(1):109-116.
- Afonso C., Almeida M. D., 1997. *Princípios Básicos de Alimentação e Nutrição*, Universidade aberta, 289 p.
- Ahmed, N.S., Dora, K.C., Chowdhury, S., Sarkar, S., Mishra, R., 2017. Effect of chitosan and acetic acid on the shelf life of sea bass fillets stored at refrigerated temperature. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(4):2175-2181.
- Akhtar, S., Khan, M.I., Faiz, F., 2013. Effect of thawing on frozen meat quality: A comprehensive review. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 23(4):198-211.
- AOAC, 1998. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition, 4th Review; Association of Official Analytical Chemists International, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, CD-ROM.
- Aquaculture, EO, 2017. *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products*.
- Atayeter, S., Ercoşkun, H., 2011. Chemical composition of European squid and effects of different frozen storage temperatures on oxidative stability and fatty acid composition. *Journal of food science and technology*, 48(1):83-89.
- Ayala, M.D., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M.J., Blanco, A., Vázquez, J.M. and Albors, O.L., 2011. Muscle tissue structure and flesh texture in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., fillets preserved by refrigeration and by vacuum packaging. *LWT-Food Science and Technology*, 44:1098-1106.
- Badiani, A., Stipa, S., Bitossi, F., Pirini, M., Bonaldo, A., Gatta, P. P., Rotolo, M., Testi, S., 2013. True retention of nutrients upon household cooking of farmed portion-size European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 72-77.
- Ballantyne, J.S., Hochachka, P.W., Mommsen, T.P., 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine Biology Letters*, 2: 75-85.
- Bandarra, N. M., Calhau, M. A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M. G., Bártolo, H., Faria, M. R., Fonseca, M. C., Gonçalves, J., Batista, I., Nunes, M. L., 2004. *Composition and Nutritional Value of Most Consumed Seafood Products in Portugal*. Publicações avulsas do IPIMAR, 11. Lisboa, Portugal: Instituto de Investigação Agrária e das Pescas IPIMAR.
- Barbosa, A., Vaz-Pires, P., 2004. Quality index method QIM: development of a sensorial scheme for common octopus *Octopus vulgaris*. *Food Control*, 15: 161-168.
- Bastias, J.M., Balladares, P., Acuña, S., Quevedo, R., Muñoz, O., 2017. Determining the effect of different cooking methods on the nutritional composition of salmon *Salmo salar* and Chilean jack mackerel *Trachurus murphyi* fillets. *PLoS ONE* 127: e0180993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180993>
- Belitz, H., Grosch, W., 1999. *Food Chemistry*. Springer, Germany, 992 p.
- Benjakul, S., Sungsi-in, R., Kijroongrojana, K., 2012. Effect of treating of squid with sodium chloride in combination with oxidising agent on bleaching, physical and chemical changes during frozen storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6):2077-2084.
- Ben-Youssef, S., Selmi, S., Ezzeddine-Najai, S. Sadok, S., 2008. Total lipids and fatty acids composition of the coastal and the deep-sea common octopus *Octopus vulgaris* populations: a comparative study. *Nutrition and health*, 193: 195-201.
- Bognár, A., 1998. Comparative study of frying to other cooking techniques influences on the nutritive value. *Grasas y Aceites*. 49: 250-260.

- Bognár, A., 2002. Tables on Weight Yield of Food and Retention Factors of Food Constituents for the Calculation of Nutrient Composition of Cooked Foods Dishes; BFE: Karlsruhe, Germany, 98 p. http://www.fao.org/uploads/media/bognar_bfe-r-02-03.pdf Acedido em 20 Junho 2018
- Borgilsson, B., Nunes, M.L., Gunnlaugsdóttir, H., 2010. Review of evidence for the beneficial effect of fish consumption. *Skýrsla Matís* 51-10, 42 p.
- Cann, D. C., 1982. Hygiene. In: *Fish Handling & Processing*, 2ª Edição (Eds. A. Aitken, I. M. Mackie., J. H. Merritt, M. L. Windsor), Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Edinburgo, pp. 161-176.
- Cao, X., Islam, M.N., Chitrakar, B., Duan, Z., Xu, W., Zhong, S., 2020. Effect of combined chlorogenic acid and chitosan coating on antioxidant, antimicrobial, and sensory properties of snakehead fish in cold storage. *Food Science and Nutrition*, 8(2), pp.973-981.
- Capillas, C.R., Moral, A., Morales, J., Montero, P., 2002. Characterisation of non-protein nitrogen in the Cephalopods volador *Illex coindetii*, pota *Todaropsis eblanae* and octopus *Eledone cirrhosa*. *Food Chemistry*, 76(2): 165-172.
- Careche, M., Barroso, M., 2009. Instrumental texture measurement in fishery products. *Quality, Safety and Authenticity* (eds. H. Rehbein and Oehlschläger), Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 214-239.
- CE, 2004. Regulamento (CE) n.º 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de outubro de 2004, relativo aos materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Diretivas 80/590/CEE e 89/109/CEE (Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 13.11.2004, p. 4-17)
- CE, 2006a. Regulamento (CE) N.º 1881/2006, do Conselho, de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 20.12.2006, L364, 29.
- CE, 2006b. Regulamento CE n.º 1924/2006, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N.º L12/3.
- CE, 2008. Regulamento (CE) n.º 1333/2008 de 16 de dezembro. Relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial*, L 354.
- CE, 2010. Regulamento (CE) N.º 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial*, L 15.
- CE, 2011a. Regulamento (CE) N.º 835/2011 da Comissão de 19 de agosto que altera o Regulamento (CE) N.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 215, 4-8.
- CE, 2011b. Regulamento CE n.º 1169/2011, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N.º L304/18.
- CE, 2015. Regulamento (UE) 2015/1005 da Comissão, de 25 de junho de 2015, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de chumbo em certos géneros alimentícios (Texto relevante para efeitos do EEE) *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N.º, 26.6.2015, p. 9–13.
- Çelik, U., Oehlschläger, J., 2004. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. *Food Chemistry*, 87: 343-347.
- CEN (European Committee for Standardization), 2003. European Standard EN 14084. Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion. CEN-European Committee for Standardization, 16 p.
- CEN (European Committee for Standardization), 2007. ES EN 15111:2007. Foodstuffs. Determination of Trace Elements. Determination of Iodine by ICP-MS (Inductively Coupled

- Plasma Mass Spectrometry); European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, pp. 1–16.
- CEN (European Committee for Standardization), 2009. EN 15763. Foodstuffs—Determination of Trace Elements—Determination of Arsenic, Cadmium, Mercury and Lead in Foodstuffs by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICPMS) after Pressure Digestion; European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, pp. 1–22.
- Chakraborty, K., Joseph, D., 2015. Inter-annual and seasonal dynamics of amino acid, mineral and vitamin composition of silver belly *Leiognathus splendens*. *Journal of Marine Biological Association of U. K.*, 95: 817-828.
- Chakraborty, K., Joy, M., Vijayagopal, P., 2016. Nutritional qualities of common edible cephalopods at the Arabian Sea. *International Food Research Journal*, 23: 1926-1938.
- Chen, C., Xia, S., He, J., Lu, G., Xie, Z. Han, H., 2019. Roles of taurine in cognitive function of physiology, pathologies, and toxication. *Life sciences*, 231, 116584.
- Chen, J. e Liu, H., 2020. Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5695.
- Chudasama, B.G., Dave, T.H., D.V., 2018. Comparative study of quality changes in physicochemical and sensory characteristics of iced and refrigerated chilled store Indian Mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4):533-537.
- 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*, 1973, 38: 431-436.
- Cohen, Z., Vonshak, A., Richmond, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: Correlation to growth rate. *Journal of Phycology*, 24: 328-332.
- Costa, S., Afonso, C., Bandarra, N. M., Gueifão, S., Castanheira, I., Carvalho, M. L., Cardoso, C., Nunes, M. L., 2013. The emerging farmed fish species meagre *Argyrosomus regius*: How culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. *Food and Chemical Toxicology*, 60: 277-285.
- Dempsey, P., Bansal, P., 2012. The art of air blast freezing: Design and efficiency considerations. *Applied Thermal Engineering*, 41: 71-83.
- Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14: 273-285.
- Devlieghere, F.; Vermeulen, A.; Debevere, J., 2010. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*. 21(6):703-714.
- Dey, S.S., K.C., 2010. Effect of sodium lactate as cryostabilizer on physico-chemical attributes of croaker (*Johnius gangeticus*) muscle protein. *Journal of food science and technology*, 47: 432-436.
- Duarte, A.M., Silva, F., Pinto, F.R., Barroso, S., Gil, M.M., 2020. Quality Assessment of Chilled and Frozen Fish—Mini Review. *Foods*, 9(12):1739.
- EC, 2014. Commission regulation EU No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation EC No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 138, 75-79, 13.5.2014.
- EC, 2015. Commission Regulation EU No. 2015/1005 of 25 June 2015 amending Regulation EC No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 161, 9-13, 26-06-2015.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3), p.1461.
- EFSA Scientific Committee, 2015. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal* 2015:13(1):3982, 36 p.

- EFSA, 2010. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies NDA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 83,1461.
- EFSA, 2014a. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iodine. *EFSA Journal*, 125, 3660. 57 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3660.
- EFSA, 2014b. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal*, 1210, 3846. 67 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3846.
- EFSA, 2014c. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal*, 1210, 3844. 76 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3844.
- EFSA, 2015a. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper. *EFSA Journal*, 1310, 4253. 51 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4253.
- EFSA, 2015b. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. *EFSA Journal*, 137, 4186. 63 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4186.
- EFSA, 2015c. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for phosphorus. *EFSA Journal*, 137, 4185. 54 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4185.
- EFSA, 2015d. EFSA Scientific Committee 2015. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal*, 131, 3982. 36 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3982.
- EFSA, 2016. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, Turck, D., Bresson, J.-L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K. I., Mangelsdorf, I., McArdle, H., Neuhäuser-Berthold, M., Nowicka, G., Pentieva, K., Sanz, Y., Siani, A., Sjödin, A., Stern, M., Tomé, D., Van Loveren, H., Vinceti, M., Willatts, P., Aggett, P., Martin, A., Przyrembel, H., Brönstrup, A., Ciok, J., Gómez Ruiz, J. Á., de Sesmaisons-Lecarré, A., Naska, A. Scientific opinion on dietary reference values for potassium. *EFSA Journal*, 1410, 4592. 56 pp.
- EFSA, 2017. (https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/DRV_Summary_tables_jan_17.pdf).
- EFSA, 2017. EFSA NDA Panel EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, Turck, D., Bresson, J.-L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K. I., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Neuhäuser-Berthold, M., Nowicka, G., Pentieva, K., Sanz, Y., Siani, A., Sjödin, A., Stern, M., Tomé, D., Van Loveren, H., Vinceti, M., Willatts, P., Aggett, P., Martin, A., Przyrembel, H., De Sesmaisons-Lecarré, A., Martínez, S. V., Naska, A. Scientific opinion on Dietary Reference Values for sodium. *EFSA Journal*. 72 pp. https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/engage/170929_draft-opinion.pdf Accessed 8 June 2018.
- EFSA, 2019. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) on Dietary Reference Values for sodium and chloride, *EFSA Supporting Publications*, 0.2903/sp.efsa.2019.EN-1679.
- Emuscado, M.E. Huber, K.C., 2009. *Edible films and coatings for food applications* (Vol. 9). New York, NY, USA: Springer.
- Emire, S.A., Gebremariam, M.M., 2010. Influence of frozen period on the proximate composition and microbiological quality of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(4):743-757.
- EPA, 2007. Test Method 7473: Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation and Atomic Absorption Spectrometry; SW-846; Environment Protection Agency: Washington, DC, EUA, 1-17.

- Erkan, N., 2011. Iodine content of cooked and processed fish in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 1734-1738.
- Ersoy, B., Özeren, A., 2009. The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish. *Food Chemistry*, 115(2): 419-422.
- EU, 2004. Regulamento (CE) n.º 1935/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de outubro de 2004, relativo aos materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Diretivas 80/590/CEE e 89/109/CEE. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N° L 338, 4-17.
- EUMOFA, 2019. The EU fish market: 2019 Edition. <https://www.eumofa.eu/documents/20178/157549/EN>
- Falguera, V., Quintero, J., Jiménez, A., Muñoz, J., Ibarz, A., 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions, and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6): 292–303.
- Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y., 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115(1):66-70.
- FAO, 2003. Food energy – methods of analysis and conversion factors. FAO Food and Nutrition paper 77. FAO, Roma, Itália, ISSN 0254-4725, 87p.
- FAO, 2013. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. FAO food and nutrition paper, 92. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- FAO, 2017, Cultured Aquatic Species Information Programme-*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758).
- FAO, 2018. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2016. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/3/i9942t/i9942T.pdf>
Acedido em outubro 2018
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Farajzadeh, F., Motamedzadegan, A., Shahidi, S.A., Hamzeh, S., 2016. The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. *Food Control*, 67:163-170.
- Fernandes, C.E., Vasconcelos, M.A.S., Ribeiro, M.A., Sarubbo, L.A., Andrade, S.A.C., Filho, A.B.M., 2014. Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. *Food Chemistry*, 160: 67-71.
- Fernández-Segovia, I., Fuentes, A., Aliño, M., Masot, R., Alcañiz, M., Barat, J.M., 2012. Detection of frozen-thawed salmon (*Salmo salar*) by a rapid low-cost method. *Journal of Food Engineering*, 113, 2: 210-216.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226: 497-509.
- Fukuda, Y., 2006. Factor influencing on restoration of fish meat after thawing. *Refrigeration*, 81, pp.171-174.
- Fukuda, Y., Okazaki, E., Wada, R., 2011. Effect of fluctuations of temperature during frozen storage on denaturation of fish myofibrillar protein. *Trace* 23(3):335-340.
- Gao, M.; Feng, L.; Jiang, T.; Zhu, J.; Fu, L.; Yuan, D.; Li, J. The Use of Rosemary Extract in Combination with Nisin to Extend the Shelf Life of Pompano (*Trachinotus ovatus*) Fillet during Chilled Storage. *Food Control*, 37:1-8.
- Gavahian, M., Tiwari, B.K., Chu, Y.H., Ting, Y. Farahnaky, A., 2019. Food texture as affected by ohmic heating: Mechanisms involved, recent findings, benefits, and limitations. *Trends in Food Science Technology*, 86: 328-339.
- Gokoglu, N., Topuz, O.K., Yerlikaya, P., Yatmaz, H.A., Ucak, I., 2018. Effects of freezing and frozen storage on protein functionality and texture of some cephalopod muscles. *Journal of aquatic food product technology*, 27(2):211-218.

- Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Cengiz, E. 2004. Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Food Chemistry*, 84: 19-22.
- Gómez-Estaca, J.; López de Lacey, A.; Gómez-Guillén, M, C.; López-Caballero, M, E.; Monter, P., 2009, Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil, *J, Aquat, Food Prod, Technol*, 18: 46–52.
- Gonçalves, A., Camacho, C., Teixeira, B., Lourenço, H., Silva, H., Vieira, H., Batista, I., Pereira, J., Ferreira, J., Martins, F., Muro, M., Bandarra, N., Conceição, P., Mendes, R., Oliveira, R., Gonçalves, S., Nunes, M.L., 2017. Valorização e promoção da qualidade de polvo da costa portuguesa. Relatório Científico Técnico do IPMA <http://ipma.pt>, nº 16, 62 p.
- Gonzalez, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D., de Sousa, G.B., 2003. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*, 20: 601–604.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 262-266.
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. In: M. Jakobsen (editor), *Symposium of Microbial Food Spoilage*, October 15-16th, Technical University of Lingby, Denmark. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 121-137
- Gullian-Klanian, M., Terrats-Preciat, M., Pech-Jiménez, E.C., Cutz De Ocampo, J., 2017. Effect of frozen storage on protein denaturation and fatty acids profile of the red octopus (*Octopus maya*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), p.e13072.
- Günlü, A., Koyun, E., 2013. Effects of vacuum packaging and wrapping with chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets in cold storage (4 C). *Food and Bioprocess Technology*, 6:1713–1719.
- Hassoun, A., Karoui, R., 2016. Monitoring changes in whiting (*Merlangius merlangus*) fillets stored under modified atmosphere packaging by front face fluorescence spectroscopy and instrumental techniques. *Food Chemistry*, 200:343-353.
- Hayashi, K., Yamamoto, S., 1987. Distribution of diacyl glyceryl ethers in the different tissues and stomach contents of gonatid squid *Beryteuthis magister*. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 53, 1057–1063.
- Held, A., 2019. Efeito da quitosana no congelamento de filés de tilápia congelados: qualidade microbiológica, físico-química e sensorial. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 39 p.
- Higgs, J. D., 2000. The Changing Nature of Red Meat: 20 Years of Improving Nutritional Quality. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 11-95.
- Hongpattarakere, T., Riyaphan, O., 2008. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30:1-9.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G., 1996. *Principles of Biochemistry*. 2nd Ed. Prentice Hall. United States of America, 493 p.
- Hosseini, H., Mahmoudzadeh, M., Rezaei, M., Mahmoudzadeh, L., Khaksar, R., Khosroshahi, N. K., Babakhani, A. 2014. Effect of different cooking methods on minerals, vitamins and nutritional quality indices of kutum roach *Rutilus frisii kutum*. *Food Chemistry*, 148, 86-91.
- Howgate, P., 2009. Traditional methods. In: *Fishery products: quality, safety and authenticity* (Eds. H. Rehbein, J. Oehlenschläger), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 19-41.
- 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.
- Huss, H. H., Ababouch, L., Gram, L., 2004. Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fisheries Technical Paper*. Roma. 444:7-12.

- 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. Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications 2nd ed., Blackwell Scientific Publications.
- INE, 2019. Estatísticas da Pesca. Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas da Pesca, Lisboa-Portugal.
- INE, 2020. Estatísticas da Pesca. Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas da Pesca, Lisboa-Portugal.
- Innes, J.K.; Calder, P.C., 2020. Marine Omega-3 (N-3) Fatty Acids for Cardiovascular Health: An Update for 2020. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 1362.
- International, 12(2), 175-197. Volpe, M.G., Siano, F., Paolucci, M., Sacco, A., Sorrentino, A., Malinconico, M., Varricchio, E., 2015. Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1):615-622.
- IPQ, 2009a. NP 2282:2009. Produtos da pesca e da aquicultura; Determinação da humidade. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 7 p.
- IPQ, 2009b. NP1972 – Produtos da pesca e da aquicultura; Determinação do teor de matéria gorda livre. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 7 p.
- IPQ, 2009c. NP 2032 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de cinza total. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 7 p.
- IPQ, 2009d. NP 2930:2009. Produtos da Pesca e da Aquicultura – Determinação do Teor de Azoto Básico Volátil Total (ABVT). Método de Conway, Instituto Português da Qualidade, Caparica, 9 p.
- IPQ, 2009e. NP 1841-1:2009. Produtos da Pesca e da Aquicultura – Determinação do Teor de Azoto de trimetilamina (ATMA). Método de Conway, Instituto Português da Qualidade, Caparica, 5 p.
- IPQ, 2010. NP4355 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do peso líquido e escorrido e do teor de água de vidragem. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 6p.
- ISO 4833, 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees. Geneva, Suíça.
- ISO, 1996. ISO 13730:1996. Meat and meat products - Determination of total phosphorus content - Spectrometric method. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1996; pp. 1–6.
- ISO, 2004. ISO 21528-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization, Geneva, 10 p.
- ISO, 2013a. ISO 4833-2. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. International Organization for Standardization, Geneva, 12 p.
- ISO, 2013b. ISO 7218:2007/AMD 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations — Amendment 1. 3 rd Ed. International Organization for Standardization, Geneva, 66 p.
- ISO, 2014. ISO 9308-1. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. International Organization for Standardization, Geneva, 10 p.
- ISO, 2017. ISO 6887-3. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products. 2nd Ed. International Organization for Standardization, Geneva, 16 p.

- 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 (Eds. T. Børresen), Food Science, Technology and Nutrition, N° 158.
- Jay, J., 2000. Microbiologia de alimentos. 6.ª Edição. Artmed Editora. Porto Alegre. 120 p.
- Jeon YJ, Kamil JYVA, Shahidi F, 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *J Agric Food Chem* 50:5167–5178
- Jo, S., Woo, H., Kwon, H., Oh, S., Park, J., Hong, Y., Pyo, H., Park, K., Há, M., Kim, H., Sohn, S., Kim, Y., Lim, J., Eom, S., Kim, B., Lee, K., Lee, J., Hwang, M., Kim, J., 2015. Estimation of the biological half-life of methylmercury using a population toxicokinetic model". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12: 9054-9067.
- Jorhem, L., 2000. Determination of metals in food by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL Collaborative study. *Journal Association of Official Analytical Chemists International*, 83(5): 1204-1211.
- Juárez, M.D., Alfaro, M.E., Sammán, N., 2003. Nutrient retention factors of deep-fried milanesas. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17: 119-124.
- Kalinowski CT, Robaina LE, Fernández-Palacios H, Schuchardt D, Izquierdo MS. 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*, 244:223-231.
- Karimian-Khosroshahi, N., Hosseini, H., Rezaei, M., Khaksar, R., Mahmoudzadeh, M., 2016. Effect of Different Cooking Methods on Minerals, Vitamins, and Nutritional Quality Indices of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *International Journal of Food Properties*, 19:2471-2480.
- Kazemi, S.M.; Rezaei, M., 2015, Antimicrobial effectiveness of gelatin-alginate film containing oregano essential oil for fish preservation, *J, Food Saf.*, 35: 482–490.
- Khalili Tilami, S., Sampels, S., 2018. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 26(2):243-253.
- Kiani, H., Sun D.W., 2011. Water crystallization and its importance to freezing of foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 407-426.
- Kier, W.M. e Smith, A.M., 1990. The morphology and mechanics of octopus suckers. *The Biological Bulletin*, 178:126-136. Kołakowska, A., 2003. Lipid oxidation in food systems. In: Chemical and functional properties of food lipids. Sikorski, Z.E., Kołakowska, A., Eds.; CRC Press LLC, Florida, USA, pp. 133-166.
- Knoerzer, K., Buckow, R., Trujillo, F.J., Juliano, P., 2015. Multiphysics simulation of innovative food processing technologies. *Food engineering reviews*, 7(2):64-81.
- Kong, F., Tang, J., Rasco, B., Crapo, C., 2007 Kinetics of salmon quality changes during thermal
- Koueta, N., Viala, H., Le Bihan, E., 2014. Applications, Uses and By-products from Cephalopods. In: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (eds), *Cephalopod Culture*. Springer, Dordrecht, pp. 131-147.
- Küçükgülmez, A., Yanar, Y., Gerçek, G., Gülnaz, O., Celik, M., 2013. Effects of chitosan on color, sensory and microbiological properties of European eel (*Anguilla Anguilla*) fillets during refrigerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5):766-771.
- Kugino, M. Kugino, K., 1994. Microstructural and rheological properties of cooked squid mantle. *Journal of food science*, 594: 792-796.
- Kumar, V., Sukumar, D., Muruganantham, M., 2015. Microbial quality of frozen squid (*Sepioteuthis lessoniana*, Lesson 1830) treated with food grade commercial chemicals. *Indian Journal of Animal Research*, 49(5):736-741.
- Lee, P.G., 1994. Nutrition of cephalopods: Fuelling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25, 35-51.
- Lepage, G., Roy, C.C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *Journal of Lipid Research*. 27: 114–119.

- Li, T., Li, J.; Hu, W.; Li, X., 2013, Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives, *Food Chem*, 2013, 138: 821–826.
- Lim, F., 2020. Illuminating Hidden Harvests: Brand identity at a glance.
- Lin, W., Zeng, Q., Zhu, Z., 2009. Different changes in mastication between crisp grass carp *Ctenopharyngodon idellus* and grass carp *Ctenopharyngodon idellus* after heating: The relationship between texture and ultrastructure in muscle tissue. *Food Research International*, 42: 271-278.
- Lourenço, H.M., Anacleto, P., Afonso, C., Ferraria, V., Martins, M.F., Carvalho, M.L., Lino, A.R., Nunes, M.L., 2009. Elemental composition of cephalopods from portuguese continental waters. *Food chemistry*, 113: 1146-1145.
- Lourenço, H.M., Bandarra, N.M., Delgado, N., Martins, M.F., Nunes, M.L., 2001. Caracterização nutricional de espécies de aquicultura. *Jornadas Técnicas e Científicas do IPIMAR*. 2001. Publicações avulsas do IPIMAR. 9: 233-239.
- Lubis, Z., Buckle, K. A., 1990. Rancidity and lipid oxidation of dried-salted sardines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25 (3): 295–303.
- Lund, B., Baird-Parker, A.C., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., Gould, G.W. eds., 2000. *Microbiological safety and quality of food (Vol. 1)*. Springer Science Business Media.
- Luo, Q., Hamid, N., Oey, I., Leong, S.Y., Kantono, K., Alfaro, A. Lu, J., 2019. Physicochemical changes in New Zealand abalone *Haliotis iris* with pulsed electric field PEF processing and heat treatments. *LWT – Food Science and Technology*, 115: 108438.
- Lyhs, U., 2009. Microbiological methods. In: *Fishery products: quality, safety and authenticity*. Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 318 - 348.
- Magnusson B. e Örnemark U., 2014. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd ed. Eurachem; Lewis, MI, USA. [(accessed on 15 March 2019)]. online: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- Manimaran, U., Shakila, R. J., Shalini, R., Sivaraman, B., Sumathi, G., Selvaganapathi, R., Jeyasekaran, G., 2016. Effect of additives in the shelflife extension of chilled and frozen stored Indian octopus (*Cistopus indicus*). *Journal of food science and technology*, 53(2):1348–1354.
- Marimuthu, K., Thilaga, M., Kathiresan, S., Xavier, R., Mas R.H.M.H., 2011. Effect of different cooking methods on proximate and mineral composition of striped snakehead fish *Channa striatus*, Bloch. *Journal of Food Science and Technology*, 49: 373-377.
- Martinsdóttir, E., Schelvis, R., Hyldig, G., Sveinsdóttir, K. 2009a. “Sensory evaluation of seafood: general principles and guidelines”. In Hartmut R. and Oehlenschläger J. eds. *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*. Chichester: Wiley-Blackwell Publishing. 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
- Matthews, K.R., Kniel, K.E., Montville, T.J., 2017. *Food microbiology: an introduction*. John Wiley&Sons.
- McHugh A.J., Feehily C., Hill, C., Cotter, P.D., 2017. Detection and Enumeration of Spore-Forming Bacteria in Powdered Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 8:109.
- Medina, I., Gallardo, J.M., Aubourg, S.P., 2009. Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International journal of food science technology*,44(8):1467-1479.
- Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T., 2016. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press LLC, 5th edition; Florida, USA; 588 p.

- Mendes, R., Vieira, H., Pereira, J., Teixeira, B., 2017. Water uptake and cooking losses in *Octopus vulgaris* during industrial and domestic processing. *LWT – Food Science and Technology*, 78: 8-15.
- Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Lalitha, K.V., Gopal, T.S., 2012. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26(1):167-174.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A.S., Torres, D., Castanheira, I., 2016. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, 193: 55-61.
- Mouritsen, O.G., Styrbæk, K., 2018. Cephalopod gastronomy—a promise for the future. *Frontiers in Communication*, 3, article.38.
- Munasinghe, D.M., Ohkubo, T., Sakai, T., 2005. The lipid peroxidation induced changes of protein in refrigerated yellowtail minced meat. *Fisheries science*, 71:462-464.
- Muramoto, K., Kamiya, H., 1990. Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol. *Analytical Biochemistry*, 189(2): 223-230.
- Murphy, E.W., Criner, P.E., Gray, B.C., 1975. Comparison of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23: 1153-1157.
- Nakazawa, N., Okazaki, E., 2020. Recent research on factors influencing the quality of frozen seafood. *Fisheries Science*, 86:231–244.
- Nash, D.M., Eaton, C.A., Crewe, N.F., 1978. Lipid classes and fatty acid composition of squid *Illex illecebrosus*. *Technical Reports of the Fisheries and Marine Service of Canada*, 833: 8 p.
- Natagawa, T., Watabe, S., Hashimoto, K., 1988. Identification of three major components in sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaihi*, 54: 999-1004.
- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183: 161–177.
- Nunes, M., Bandarra, N., Batista, I., 2011. Health benefits associated with seafood consumption. Em C. Alasalvar, F. Shahidi, K. Miyashita U. Wanasundara, *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications* (pp. 369-376). Wiley-Blackwell.
- Nunes, M.L., Batista, I., 1991. Congelamento e armazenagem do pescado congelado. Edição Escola <portuguesa de Peças, 50 p.
- Nunes, M.L.; Batista, I.; Bandarra, N. M.; Morais, M. G.; Rodrigues, P. O., 2008. Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, nº 18, 77 p.
- O'dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J. Wells, J., 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 113: 239-258.
- Oehlenschläger, J., Rehbein, H., 2009. Basic facts and figures. In: *Fishery products: quality, safety and authenticity* (Eds. H. Rehbein e J. Oehlenschläger), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 1-18.
- Ogawa, M., Maia, E.L., 1999. *Manual de Pesca - Ciência e Tecnologia do Pescado*. Vol. 1. São Paulo: Livraria Varela; 430 p.
- Ordóñez-Peneda, J. A., 2005. *Tecnologia de alimentos - vol. 2, Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre (RS): ART-MED Editora; 280p.
- Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F. Rastrelli, L., 2002. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25): 7314-7322.
- Pereda M, Ponce AG, Marcovich NE, Ruseckaite RA, Martucci JF., 2011. Chitosan–gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocoll.*, 25:1372–1381.

- Pereira, R.N.; Vicente, A.A., 2009. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7):1936-1943.
- Perelló, G., Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Domingo, J.L., 2008. Effects of various cooking processes on the concentration of arsenic, cadmium, mercury and lead in foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 11262-11269.
- Piedrahíta Márquez, D.G., Fuenmayor, C.A., Suarez Mahecha, H., 2019. Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (*Piaractus brachypomus*) vacuum-packed fish fillets. *Packaging Technology and Science*, 32(3):143-153.
- Piepoli, M., Hoes, A., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A. et al., 2016. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*, 37(29): 2315-2381.
- Qiu, X.; Chen., Liu, G.; Yang, Q., 2014, Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets stored at 4 C by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract, *Food Chem*, 162: 156–160.
- Raimundo, J., Vale, C., Canário, J., Branco, V. Moura, I., 2010. Relations between mercury, methyl-mercury and selenium in tissues of *Octopus vulgaris* from the Portuguese Coast. *Environmental Pollution*, 158: 2094-2100.
- Raman, M., Mathew, S., 2015. Physicochemical and textural alterations in Indian squid (*Loligo duvauceli*) mantle during frozen storage and cooking. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(5), pp.454-467.
- Ramos, O., Fernandes, J., Silva, S., Pintado, M., Malcata, F., 2012. Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(6): 533–52.
- Reyes, R., Finol, H., Bello, R., 2009. Efecto de la Congelación y la cocción sobre la ultraestructura de brazos de pulpo (*Octopus vulgaris*). *Acta Microscópica*, Vol. 18, No. 2: 76-80.
- Reza, M.S., Bapary, M.A., Ahasan, C.T., Islam, M.N., Kamal, M., 2009. Shelf life of several marine fish species of Bangladesh during ice storage. *International journal of food science & technology*, 44: 1485-1494.
- Rezaabad, M.K., Khodanazary, A., Hosseini, S.M., 2017. Effect of chitosan treatments and vacuum packaging on the shelf life of spangled emperor *Lethrinus nebulosus* fillets stored in refrigerator. *Journal of Packaging Technology and Research*, 1(3):157-164.
- Rittenschober, D., Nowak, V., Charrondiere, U.R., 2013. Review of availability of food composition data for fish and shellfish. *Food chemistry*, 141(4):4303-4310.
- Rjeibi, M., Metian, M., Hajji, T., Guyot, T., Chaouacha-Chekir, R.B., Bustamante, P., 2014. Seasonal Survey of Contaminants Cd and Hg and Micronutrients Cu and Zn in Edible Tissues of Cephalopods from Tunisia: Assessment of Risk and Nutritional Benefits. *Journal of Food Science*, 80: T199-T206.
- Rosa, R., Bandarra, N.M., Nunes, M.L., 2007. Nutritional quality of African catfish *Clarias gariepinus* Burchell 1822: a positive criterion for the future development of the European production of Siluroidei. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 342-351.
- Rosa, R., Costa, P.R., Nunes, M.L., 2004. Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* Mollusca: Cephalopoda. *Marine Biology*, 145: 563-574.
- Rosa, R., Nunes, L., Sousa Reis, C., 2002. Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), from three areas of the Portuguese coast. *Marine Science*, 71: 739-751.
- Rosa, R., Pereira J., Costa, P.R., Nunes, M.L., 2006. Distribution, abundance, biology and biochemistry of the stout bobtail squid *Rossia macrosoma* from the portuguese coast. *Marine Biology Research*, 2: 14-23.

- Rosa, R., Pereira J., Nunes, M.L., 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis* sp. *Marine Biology Research*, 146(4): 739-751.
- Rosa, R.A., Nunes, M.L., Sousa Reis, C., 2000. Variações sazonais da composição bioquímica do polvo-comum, *Octopus vulgaris*, em três zonas da costa portuguesa. *Relatório Científico Técnico Do Instituto de Investigação das Pescas e do Mar*, 61, 26 p.
- Rosas-Romero, Z.G., Ramirez-Suarez, J.C., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M.E., Carvallo-Ruiz, G., García-Sánchez, G., 2010. Partial characterization of an effluent produced by cooking of Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Bioresource Technology*, 101: 600-605.
- Saint-denis, T.; Goupy, J., 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.515:191- 198.
- Sampels, S., 2015. The effects of storage and preservation technologies on the quality of fish products: A review. *Journal of food processing and preservation*, 39(6):1206-1215.
- Sanchez-Alonso I., Martinez, I., Sánchez-Valencia, J., Careche, M., 2012. Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) by low field NMR. *Food Chemistry*, 135: 1626–1634.
- Sánchez-González, I., Carmona, P., Moreno, P., Borderías, J., Sánchez-Alonso, I., Rodríguez-Casado, A., Careche, M., 2008. Protein and water structural changes in fish surimi during gelation as revealed by isotopic H/D exchange and Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 106: 56–64.
- Sant'Anna, V., Gurak, P.D., Marczak, D.F., Tessaro, I.C., 2013. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98: 601-608.
- Santos, F.X., Padua, G.W., 1999. Tensile properties and water absorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2070-2074.
- Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., Santos-Silva, F., 2002. Effect of genotype, feeding and slaughter weight on the quality of light lambs II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77: 187-194.
- Sarower, M.G., Hasanuzzaman, A.F.M., Biswas, B., Abe, H., 2012. Taste producing components in fish and fisheries products: A review. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 2(2):113-121.
- Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., Prinyawiwatkul, W., 2007. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorboscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83(3):366-373.
- Schubring, R., 2009. Colour measurement. In: H. Rehbein and J. Oehlenschläger (eds), *Fishery products: quality, safety and authenticity*, Blackwell Publishing Ltd John Wiley and Sons, United Kingdom, pp. 127-172.
- Shanmugam, S.A., 2014. Studies on improvement in sensory quality and acceptability of frozen squid (*Sepioteuthis lessoniana*). *International Journal of Current Research*, 6(12):10455-10459.
- Sharifian S, Zakipour E, Mortazavi MS, Arshadi A. Quality assessment of tiger tooth croaker (*Otolithes ruber*) during ice storage. *Int j Food Proper*. 2011: 14:309 – 318.
- Sikorski ZE, Kolodziejska H., 1986. The composition and properties of squid meat. *Journal of Food Chemistry*, 20, 213–224. doi: 10.1016/0308-8146(86)90174-3.
- Sikorski, Z. E., 1994. The myofibrillar proteins in seafood. In: *Seafood Proteins*. (Sikorski, Z. E., Pan, B. S. and Shahidi, F., Eds), pp 40-57, Chapman & Hall, New York
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A., Burt, J.R., 1990. Postharvest biochemical and microbial changes. In: *Seafood: resources, nutritional composition and preservation* (Eds. Z. E.Sikorski) CRC Press, Florida, USA, pp. 55-75.

- Simoupolus, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. The centre of genetics, nutrition and health. *Experimental Biology and Medicine*. 233: 674-688.
- Soares, N., Silva, P., Barbosa, C., Pinheiro, R., Vicente, A.A., 2017. Comparing the effects of glazing and chitosan-based coating applied on frozen salmon on its organoleptic and physicochemical characteristics over six-months storage. *Journal of Food Engineering*, 194:79-86.
- Soares, N.M., Oliveira, M.S., Vicente, A.A., 2015. Effects of glazing and chitosan-based coating application on frozen salmon preservation during six-month storage in industrial freezing chambers. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2):524-531.
- Sobral, M., Cunha, S., Faria, M., Ferreira, I., 2018. Domestic Cooking of Muscle Foods: Impact on Composition of Nutrients and Contaminants. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 309-333.
- Socaciu, M. I., Semeniuc, C. A., Vodnar, D., 2018, Edible films and coatings for fresh fish packaging: Focus on quality changes and shelf-life extension. *Coatings*, 8(10):366-385.
- Souza, B.W., Cerqueira, M.A., Ruiz, H.A., Martins, J.T., Casariego, A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21):11456-11462.
- Storelli, M.M., Barone, G., Marcotrigiano, G.O., 2005. Cadmium in cephalopod molluscs: implications for public health. *Journal of food protection*, 68(3): 577-580.
- Sun, Y., Liang Ma, Mingsi Ma, Hong Zheng, Xiaojie Zhang, Luyun Cai, Jianrong Li & Yuhao Zhang, 2018. Texture characteristics of chilled prepared Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) during storage, *International Journal of Food Properties*, 21: 242-254.
- Suyatma, L., Tighzert, N.E., Copinet, A., 2005. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 3950-3957.
- Ten Brink, B., Daminink, C., Joosten, H.M.L.J., Huisin't Veld, J.H.J., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11:73-84
- Thanonkaew, A., Benjakul S., Visessanguan, W., 2006. Chemical composition and thermal property of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle. *Journal of Food Composition Analysis*, 19(2-3): 127-133.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Decker, E.A., 2008. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle during frozen storage. *LWT-Food Science and Technology*, 41(1):161-169.
- Tilami, K. and Sampels, S., 2018. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26:243-253.
- Tironi V., Lebail A., de Lamballerie M., 2007. Effects of pressure-shift freezing and pressure-assisted thawing on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Journal of Food Science* 72 (7): 381–387.
- Tironi, V., De Lamballerie, M., Le-Bail, A., 2010. Quality changes during the frozen storage of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle after pressure shift freezing and pressure assisted thawing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4):565-573.
- Tironi, V., Lamballerie-Anton, M., Le-Bail, A., 2009. DSC determination of glass transition temperature on Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle: effect of high-pressure processing. *Food Bioprocess Technol.*, 2: 374-382.
- UE, 2004. Regulamento (CE) n.º 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de outubro de 2004, relativo aos materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Diretivas 80/590/CEE e 89/109/CEE. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N.º L 338, pp. 4–17
- UE, 2011. Regulamento (UE) n. o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros

- alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. o 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Diretivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n. o 608/2004 da Comissão. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N.º L 304, p. 18–63.
- Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T., 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338: 985-992.
- Uran, H., Gokoglu, N., 2014. Effects of cooking methods and temperatures on nutritional and quality characteristics of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Food Science and Technology*, 51(4): 722–728. <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0551-5>
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2009. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2):536-547.
- Venugopal, V., & Shahidi, F., 1996. Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12: 175-197.
- 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.
- Wan, Y., Wu, H., Yu, A., Wen, D., 2006. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. *Biomacromolecules*, 7: 1362–1372.
- WHO/FAO, 2012. Code of practice for fish and fishery products. *Codex Alimentarius*. 2ª Edição. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of The United Nation. Roma, Itália.
ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Practice_code_fish/CCFFP_2012_EN.pdf
- Wolter, G., 2020. Foolproof Fish: Modern Recipes for Everyone, Everywhere.
- Wongwichian, C., Klomkiao, S., Panpipat, W., Benjakul, S., Chaijan, M., 2015. Interrelationship between myoglobin and lipid oxidations in oxiye scad (*Selar boops*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 174: 279-285.
- Yu, D., Jiang, Q., Xu, Y.; Xia, W., 2017. The shelf-life extension of refrigerated grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets by chitosan coating combined with glycerol monolaurate, *Int, J, Biol, Macromol.*, 101: 448–454.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*, 5th ed.; Prentice Hall Pearson: Upper Saddle River, NJ, USA, 944 p.
- Zaritzky, N., 2011. Physical-chemical principles in freezing. In *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*, ed. Sun, D.W., Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC, pp. 3–38.

Anexo 1



Divisão de Aquacultura, Valorização e Bioprospeção

Laboratório de Análise Sensorial

Escala de intensidade e atributos/descriptores para avaliação descritiva de polvo cozido, caldo de cozedura de polvo e pratos de polvo

Intensidade do atributo/descriptor	Pontos
Ausente	1
Ligeiro	2
Moderado	3
Intenso	4
Muito intenso	5

ATRIBUTOS	DESCRITORES
Aplicável a polvo cozido ultracongelado, caldo de cozedura e pratos de polvo (polvo à lagareiro e arroz de polvo)	
CHEIRO TÍPICO A POLVO COZIDO	Típico a polvo cozido
CHEIROS ESTRANHOS/ALTERADOS	Azedo, amoniacal, velho/mofo, oxidado, outros (a descrever)
COR TÍPICA DA PELE	Púrpura característica de polvo cozido (ver termos específicos em baixo)
ALTERAÇÕES DA COR DA PELE	acastanhada, sinais de oxidação
SABORES ESTRANHOS/ALTERADOS	Azedo, amoniacal, velho/mofo, amargo, oxidado, outros (a descrever)
SINAIS DE DESIDRATAÇÃO (PELE E/OU MÚSCULO)	Sem sinais de desidratação, desidratação intensa
SUCULÊNCIA	músculo muito seco, fibroso, pastoso (1 pontos) a muito suculento (5 pontos)
COR TÍPICA DO CALDO DE COZEDURA	Alaranjada (laranja-tijolo) característica de polvo de rocha (ver termos específicos em baixo)

ATRIBUTOS/DESCRITORES/TERMOS ESPECÍFICOS - aplicável a polvo cozido ultracongelado e pratos de polvo (polvo à lagareiro e arroz de polvo)

Intensidade	Pontos	COR PÚRPURATÍPICA DA PELE	INTEGRIDADE DA PELE
Ausente	1	Ausente	Ausente (pele muito "rasgada")
Ligeiro	2	Ligeira (púrpura clara)	Ligeira
Moderado	3	Moderada	Moderada
Intenso	4	Intensa	Intensa
Muito intenso	5	Muito intensa (púrpura muito escura)	Muito intensa (intacta, muito aderente, não se observa o músculo)

Anexo 1



Divisão de Aquacultura, Valorização e Bioprospeção

Laboratório de Análise Sensorial

Escala de intensidade e atributos/descriptores para avaliação descritiva de polvo cozido, caldo de cozedura de polvo e pratos de polvo

ATRIBUTOS/DESCRITORES/TERMOS ESPECÍFICOS - aplicável a polvo cozido ultracongelado e pratos de polvo (polvo à lagareiro e arroz de polvo)

Intensidade	Pontos	GRAU DE COZEDURA	TENRURA	SABOR A SAL
Ausente	1	Ausente (cozedura insuficiente)	Ausente (músculo muito firme)	Ausente
Ligeiro	2	Ligeira	Ligeira	Ligeiro (insosso)
Moderado	3	Moderada (cozedura adequada)	Moderada (músculo firme, mas mastigável)	Moderado (adequado)
Intenso	4	Intensa	Intensa	Intenso(salgado)
Muito intenso	5	Muito intensa (demasiado cozido)	Muito intensa (músculo muito tenro, fácil mastigabilidade)	Muito intenso (demasiado salgado)

ATRIBUTOS/DESCRITORES/TERMOS ESPECÍFICOS - aplicável ao caldo de cozedura de polvo

Intensidade	Pontos	COR ALARANJADA	SABOR A SAL
Ausente	1	Ausente	Ausente
Ligeiro	2	Ligeira (laranja-tijolo clara)	Ligeiro (insosso)
Moderado	3	Moderada	Moderado (adequado)
Intenso	4	Intensa	Intenso(salgado)
Muito intenso	5	Muito intensa (laranja-tijolo muito escura)	Muito intenso (demasiado salgado)

Anexo 2



Divisão de Aquacultura, Valorização e Bioprospeção Laboratório de Análise Sensorial

Escala de intensidade e atributos/descriptores para avaliação descritiva de filetes de robalo, crus e cozidos

Intensidade do atributo/descriptor	Pontos
Ausente	0
Ausente a ligeiro	1
Ligeiro	2
Ligeira a moderado	3
Moderado	4
Moderado a intenso	5
Intenso	6
Intenso a muito intenso	7
Muito intenso	8

ATRIBUTOS	DESCRITORES
Aplicável a filetes de robalo, crus e cozidos	
CHEIRO CARATERÍSTICO	A peixe cru, leve, fresco
CHEIROS ESTRANHOS/ALTERADOS	Metálico, velho/mofo, azedo, fermentado, amoniacal, sulfídrico, pútrido, oxidado (ranço), outro (a descrever)
COR CARATERÍSTICA	Característica a peixe cru ou cor branca característica de peixe cozido
OUTRA COR/ALTERAÇÕES DA COR -	Bege, creme, amarelada, acinzentada, acastanhada, esverdeada, outra (a descrever)
BRILHO	Baço (0) a muito brilhante (8)
SINAIS DE DESIDRATAÇÃO	Aplicado especialmente a filetes congelados
ATRIBUTOS	DESCRITORES
Aplicável a filetes de robalo cozidos	
SABOR CARATERÍSTICO A PEIXE COZIDO	A peixe cozido, leve
OUTROS SABORES/SABORES ALTERADOS	Azedo/ácido, amargo, adocicado, amoniacal, oxidado (ranço), sulfídrico, pútrido, salgado, outro (a descrever)
TEXTURA / FIRMEZA	muito mole/pastoso (0 pontos) a muito firme (8 pontos)
TEXTURA/- SUCULÊNCIA	muito seco (0 pontos) a muito suculento (8 pontos)