



***INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO SAZONAL NO VALOR
NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA
AMÊIJOA-BOA PRODUZIDA EM AQUACULTURA***

Marta Andreia Gonçalves Matias

2013



***INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO SAZONAL NO VALOR
NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA
AMÊIJOA-BOA PRODUZIDA EM AQUACULTURA***

Marta Andreia Gonçalves Matias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da
Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Professor Doutor José
Miguel Pestana Assunção

2013

Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da amêijoia-boia produzida em aquacultura

Copyright © 2013 de Marta Andreia Gonçalves Matias

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Instituto Politécnico de Leiria

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação de projeto 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

Agradeço:

Ao professor Doutor José Pestana, pela sua disponibilidade para orientar este trabalho, pela infinita paciência, por todos os conselhos e conhecimentos, extremamente úteis, e pelo apoio prestado ao longo da sua realização.

À professora Maria José Rodrigues pela sua disponibilidade, ajuda e pelos conhecimentos nas análises microbiológicas.

Agradeço ainda a toda a equipa técnica da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar pela sua inteira disponibilidade em prestar a sua ajuda neste trabalho, nomeadamente Técnico Superior Pedro Ramalho, Técnica Superior Vera Severiano e Técnica Superior Cristina Correia.

A todos os colegas e amigos que contribuíram com o seu apoio, estímulo para a execução deste trabalho, pelo seu encorajamento contínuo, críticas e sugestões pertinentes para o melhoramento, agradecendo especialmente à Cláudia Tavares, Márcia Caramalho, Ana Rita Monteiro, Ana Catarina Silva, Mafalda Severiano e Rafael Paulo.

À minha família, pelo auxílio prestado durante todo o mestrado, pelo apoio e carinho.

Resumo

A aquacultura em Portugal encontra-se sob a influência do Mar Mediterrâneo e do Oceano Atlântico e, devido às suas características geográficas, apresenta um potencial único para a atividade aquícola e, também, para o desenvolvimento da cultura de novas espécies com interesse comercial. Devido ao elevado consumo em Portugal de bivalves em várias épocas do ano e sendo um alimento muito perecível e filtrador é necessário avaliar a sua estabilidade e a sua influência na variação sazonal. Com o presente estudo pretendeu-se verificar a existência de diferenças no valor nutricional da amêijoia-boia em três épocas do ano (inverno de 2012, primavera e verão de 2013) e estabelecer o tempo de prateleira da amêijoia-boia à temperatura de refrigeração de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Recorreu-se aos métodos de referência para a determinação do valor nutricional e de alguns parâmetros de qualidade na avaliação do tempo de prateleira. Sendo o chumbo e o cádmio potenciais perigos químicos presentes neste tipo de alimento, procedeu-se também à sua quantificação. A composição nutricional da amêijoia-boia variou entre os 80 – 90% em relação à humidade, com valores de proteína entre os 9% e 15% e a gordura foi de 0,2%. Em relação aos teores de cinza, estes apresentaram valores na ordem de 1% a 3%. Os teores de sódio apresentaram valores entre os 29-230mg/100g, os teores de fósforo na ordem dos 89-258mg/100g e os teores de potássio entre 108-161mg/100g. A concentração de metais pesados analisados nas amêijoas foi abaixo dos teores máximos permitidos pela legislação. Para o tempo de prateleira, este foi determinado pelo teor de azoto básico volátil total (ABVT), índice de ácido tiobarbitúrico (TBA), pH e os critérios microbiológicos estabelecidos legalmente. Durante dez dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) ocorreu a deteiorização da qualidade da amêijoia que se iniciou no oitavo dia de conservação resultante das atividades autolíticas e bacteriana. A oxidação lipídica ocorreu a partir do primeiro dia e não houve variações significativas no valor de pH, apesar do aumento ligeiro ao longo do tempo, com exceção no décimo dia em que este diminuiu podendo dever-se a morte das amêijoas. A presença de *Salmonella spp.* e *Vibrio sp.*, nas amêijoas analisadas não foi conclusiva, devido a falta do teste de confirmação. Na pesquisa de coliformes e de *E.coli*, estes resultados apresentaram-se conforme os critérios de segurança alimentar para o tempo de prateleira estudado.

Em conclusão, não houve diferenças significativas em relação a variação sazonal das amêijoas estudadas e não foi possível estabelecer o tempo de prateleira das amêijoas por falta de confirmação dos resultados microbiológicos.

Palavras-chave: variação sazonal, valor nutricional, amêijoia-boia, avaliação da estabilidade

Abstract

Portugal, due to its geographical characteristics since is under the influence of the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean presents a unique potential not only for the aquaculture activity but also for the development of the culture of new species with commercial interests. In Portugal, bivalves are highly consumed independently of the time of the year, thus it's crucial to assess their stability and seasonal variation. The thesis presented has as main goals to verify the existence of differences in the nutritional value of grooved carpet shell in (the winter 2012, spring and summer 2013) and to establish the shelf life of grooved carpet shell to refrigeration temperature of $\pm 5^{\circ}\text{C}$. To determine the nutritional value and shelf time it was used the reference methods. Also, it was taken into consideration the potential chemical hazards that could be obtained due to the presence of lead and cadmium in this type of food. The nutritional composition of grooved carpet shell ranged between 80 - 90% moisture, introduced between 9% and 15% protein and 0.2% fat. On the other hand, the sodium content ranged between 1% to 3% ash. The levels of sodium, phosphorus and potassium were 29-230mg/100g, 89-258mg/100g and 108-161mg/100g respectively. The concentration of heavy metals in clams analyzed was below the maximum allowed. The shelf life was determined by the content of total volatile basic nitrogen (TVB-N), thiobarbituric acid index (TBA), pH and compliance with microbiological criteria legally established. It was possible to analyze that during the ten days of storage under refrigeration ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) the deterioration quality of the claim that resulted from autolytic and bacterial occurred on the eighth day . On the other hand, lipid oxidation occurred on the first day and there were no significant changes in pH except on the tenth day that can be explained by the early death of clams. The presence of *Salmonella* spp. and *Vibrio* sp, the clams analyzed was inconclusive due to lack of confirmation in the test. In detecting coliforms and *E. coli*, these results were presented as the criteria for food safety shelf life study. In conclusion, no significant differences in the seasonal variation of the grating clams studied and it was not possible to establish the time of clams shelf for lack of microbiological confirmation of results.

In conclusion, there were no significant differences in the seasonal variation of the grating clams studied and it was not possible to establish the time of clams shelf for lack of microbiological confirmation results.

Keywords: seasonal variation, nutritional value, grooved carpet shell, stability evaluation

ÍNDICE

Agradecimentos.....	IV
Resumo	VI
Abstract	VIII
1. Revisão da literatura.....	1
1.1. Produção de bivalves em aquaculturas	1
1.2. Características gerais da amêijoia boa (<i>Ruditapes decussatus</i>).....	2
1.2.1. Sistemática.....	2
1.2.2. Morfologia.....	3
1.2.3. Distribuição geográfica	4
1.2.4. Habitat	4
1.2.5. Parâmetros ambientais.....	4
1.2.6. Reprodução.....	5
1.2.7. Captura.....	5
1.2.8. Produção de amêijoas em aquacultura.....	6
1.3. Composição nutricional da amêijoia	7
1.3.1. Humidade.....	7
1.3.2. Proteínas	8
1.3.3. Lípidos.....	9
1.3.4. Minerais.....	10
1.3.4.1. Fósforo.....	10
1.3.4.2. Potássio	11
1.3.4.3. Sódio.....	11
1.4. Contaminantes	12
1.4.1. Metais Pesados	12
1.4.1.1. Cádmio.....	13
1.4.1.2. Chumbo.....	14
1.4.2. Parâmetros microbiológicos.....	15
1.4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	17

1.4.2.2. <i>Salmonella</i>	18
1.4.2.3. <i>Vibrio sp.</i>	20
1.5. Estabilidade dos bivalves.....	21
1.5.1. pH.....	22
1.5.2. Azoto básico volátil total (ABVT).....	22
1.5.3. Rancidez oxidativa.....	23
1.6. Zonas de Produção (Classificação)	24
1.7. Regras de higiene da venda de bivalves	25
2. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos	29
3.1. Avaliação sazonal do valor nutricional e dos contaminantes ambientais	29
3.1.1. Amêijoas-boas.....	29
3.1.2. Dados biométricos	29
3.1.3. Preparação da amostra da amêijoas boas	30
3.1.4. Avaliação do valor nutricional.....	30
3.1.4.1. Teor de humidade	30
3.1.4.2. Teor proteínico	32
3.1.4.3. Teor de gordura total	34
3.1.4.4. Teor de cinzas	36
3.1.4.5. Determinação dos minerais	38
3.1.4.5.1. Determinação de potássio, sódio, chumbo e cádmio	38
3.1.4.5.2. Determinação de fósforo	40
3.2. Avaliação da qualidade das amêijoas durante a refrigeração	42
3.2.1. Preparação da amostra.....	42
3.2.1.2. Determinação do pH.....	42
3.2.1.3. Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT)	43
3.2.1.4. Determinação do teor de ácido tiobarbitúrico (TBA)	46
3.2.2. Avaliação microbiológica.....	48
3.2.2.1. Preparação da amostra	48
3.2.2.2. Preparação dos diluentes e dos meios de cultura	48
3.2.2.3. Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	48

3.2.2.4. Pesquisa de bactérias Coliformes e pesquisa provável de <i>E.coli</i>	50
3.2.2.5. Pesquisa <i>Vibrio sp.</i>	52
3.3 Análise Estatística	54
4. Resultados e Discussão	55
4.1.Dados biométricos.....	55
4.2. Composição nutricional	56
4.2.1 Humidade	57
4.2.2 Proteína	58
4.2.3 Gordura	59
4.2.5 Minerais	60
4.2.5.1.Cinza.....	60
4.2.5.1 Sódio.....	60
4.2.5.2 Potássio	61
4.2.5.3 Fósforo.....	61
4.2.6 Metais Pesados	61
4.2.6.1 Chumbo e cádmio	61
4.3. Avaliação da qualidade das amêijoas durante a refrigeração.....	62
4.3.1 pH 63	
4.3.2 Azoto básico volátil total (ABVT)	64
4.3.3 Índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)	65
4.4.Avaliação microbiológica	66
4.4.1. Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	67
4.4.2. Pesquisa de bactérias Coliformes e pesquisa provável de <i>E.coli</i>	67
4.4.3. Pesquisa <i>Vibrio sp.</i>	68
5. Conclusão e perspectivas futuras.....	69
6. Bibliografia.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Amêijoia-Boa (<i>Ruditapes decussatus</i>).....	3
Figura 1.2. Anatomia da amêijoia <i>Ruditapes decussatus</i>	3
Figura 1.3. Principais países produtores da <i>Ruditapes decussatus</i> (FAO,2011)	4
Figura 1.4. Esquema geral do mecanismo da rancidez oxidativa (Ramalho & Jorge, 2005).....	24
Figura 3.1. Amêijoia-Boa (<i>Ruditapes decussatus</i>).....	29
Figura 3.2. Medição da amêijoia-boa através do paquímetro	30
Figura 3.3. Pesagem da amêijoia-boa.....	30
Figura 3.4. Secagem da amostra em estufa	31
Figura 3.5. Destilação por arrastamento de vapor e recolha do ácido bórico.....	34
Figura 3.6. Evaporação do clorofórmio no rotavaporador	36
Figura 3.7. Inceneração da toma em mufla	37
Figura 3.8. Espectrofotometria de absorção atômica por chama	40
Figura 3.9. Medição do pH por potenciometria.	43
Figura 3.10. Titulação com solução de ácido clorídrico até obtenção da coloração rosa.	45
Figura 4.1. Valores de pH representante da deterioração da amêijoia-boa durante 10 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	64
Figura 4.2. Valores de ABVT da amêijoia-boa durante 10 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	65
Figura 4.3. Valores de TBA da amêijoia-boa durante 10 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. A classificação sistemática da <i>Ruditapes decussatus</i> , segundo (Parker,1982)	2
Tabela 1.2. Composição nutricional dos macroconstituintes por 100g da amêijoia crua (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2006).....	7
Tabela 1.3. Composição nutricional dos minerais por 100g da amêijoia crua (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2006)	7
Tabela 1.4. Classificação das zonas de produção de moluscos bivalves baseada em critérios bacteriológicos (<i>Escherichia coli</i>) (Despacho N.º 14515/2010)	25
Tabela 3.1. Soluções padrões para a realização da curva de calibração.	42
Tabela 2.2. Soluções padrões para determinação do índice TBA	47
Tabela 4.1 Variação sazonal dos dados biométricos da amêijoia-boia	55
Tabela 4.2. Variação sazonal da composição nutricional da amêijoia-boia	57
Tabela 4.3. Avaliação da deterioração das amêijoas durante 10 dias de armazenamento em refrigeração (± 5 °C)	63

LISTA DE SIGLAS

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

DGPA - Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura

ESTM - Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

FAO - Food and Agriculture Organization

FDA - Food and Drug Administration

HACCP- Hazard analysis and critical control points

IPMAR- Instituto Português do Mar e da Atmosfera

WHO- World Health Organization

1. Revisão da literatura

1.1. Produção de bivalves em aquaculturas

A aquacultura consiste na criação de organismos aquáticos em áreas costeiras. Esta envolve a intervenção humana no processo de criação, para aumentar a produtividade individual e em grupo da matéria cultivada (FAO, 2013).

O seu principal objetivo é a produção de proteína de origem animal para o consumo humano, cumprindo assim o princípio básico da atividade, isto é, de aumentar a quantidade de alimento disponível e converter alimento de baixo valor económico noutra com valor mais elevado (Henriques, 1998).

Existe três tipos de cultura: a) regime extensivo, b) semi-intensivo, e c) intensivo.

O regime extensivo aproveita-se exclusivamente das condições naturais disponíveis, incluindo o alimento. Neste regime, o cultivo de animais é feito em lagoas terrestres (salinas e lagoas de antigos moinhos de maré) em que o repovoamento é feito com organismos juvenis que entram com as marés, pelas comportas, ou que são capturados em bancos naturais e posteriormente semeados em zonas entre - marés, lagunares e estuarinas, como são o caso da produção de bivalves em Portugal (IPMAR, 2008).

Na cultura em regime semi-intensivo, ainda existe um nível baixo de controlo sobre o sistema de produção. Neste regime as densidades das cargas são mais elevadas do que no regime extensivo. A produção é planeada, recorrendo-se à reprodução artificial (em maternidades), para obtenção de ovos e juvenis. A fase de engorda é monitorizada de modo a otimizar o crescimento. Aqui, ocorre o aproveitamento do alimento natural existente no meio e a dieta é complementada com rações comerciais (Henriques, 1998).

O regime intensivo caracteriza-se pela utilização de elevadas densidades de cargas. Existe um elevado índice de controlo de todos os parâmetros de produção (desde a reprodução e crescimento à qualidade da água), utilizando tecnologia e técnicas mais avançadas para atingir uma eficiência elevada de produção. Esta é assegurada exclusivamente por uma alimentação artificial (Henriques, 1998).

Devido à sua localização geográfica, Portugal encontra-se sob influência do Mar Mediterrâneo e do Oceano Atlântico, apresentando um grande potencial para a atividade aquícola e para o desenvolvimento da cultura de novas espécies com interesse comercial (Diniz, 1998).

A cultura de moluscos bivalves realiza-se em viveiros ou em cordas suspensas (“long line”), concentrando a maioria das empresas localizadas no Algarve na Ria Formosa, em Aveiro na Ria de Aveiro e no estuário do Sado. As principais espécies de moluscos bivalves cultivadas são: as ostras (*Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*) e a amêijoia (*Ruditapes decussatus*) (Henriques, 1998).

A produção mundial em 2009 de amêijoia é dominada pela China, que responde por 98 % dessa produção em aquacultura. A União Europeia e a Coreia são igualmente produtores importantes. Na União Europeia, a Itália (>30 000 toneladas) é, de longe, o principal produtor de amêijoas, à frente de Portugal (entre 1000 a 3000 toneladas), França(entre 1000 a 3000 toneladas), e Espanha (entre 500 a 100 toneladas). Em Itália, a quase totalidade das amêijoas é cultivada em lagunas no nordeste do Adriático e no delta do rio Pó que se situa entre as entre as províncias italianas de Rovigo e de Ferrara, parte da produção destas zonas de Itália provém de um regime de gestão das unidades populacionais com algum controlado. O comércio com países terceiros é bastante limitado, verificando-se algumas importações provenientes da Coreia do Sul com destino a Espanha e a Portugal. O comércio entre países da União é igualmente limitado, com fluxos pouco significativos de França e Itália para Espanha (Comissão Europeia, 2013).

A *Ruditapes decussatus* é a espécie de bivalve mais produzida em Portugal. Segundo a Direção Geral da Pescas e Aquacultura a produção da amêijoia-boia relativamente ao ano de 2011 foi de 23386 toneladas (DGPA, 2013).

1.2. Características gerais da amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*)

1.2.1. Sistemática

A classificação sistemática da *Ruditapes decussatus* (Tabela 1.1.), segundo Parker (1982), é a seguinte:

Tabela 1.1. A classificação sistemática da *Ruditapes decussatus*, segundo (Parker,1982)

Phylum: Mollusca
Classe: Bilvia
Subclasse: Heterodonta
Ordem: Veneroida
Família: Veneridae
Género: Ruditapes
Espécie: <i>Ruditapes decussatus</i>



Figura 1.1.Amêijoia- Boa (*Ruditapes decussatus*)

1.2.2. Morfologia

A amêijoia consegue atingir os 7-8cm. A concha apresenta estrias concêntricas que são quebradas por linhas radiais onduladas muito próximas.

Possuem dois sífões, o inalante e o exalante, que se estendem até a superfície. Através do sífão inalante é criada uma corrente que transporta água, partículas alimentares microscópicas e oxigênio, para serem filtrados e assimilados pelo animal. O sífão exalante transporta partículas não digeridas e produtos de excreção para o exterior (Figura 1.2) (Henriques,1998).

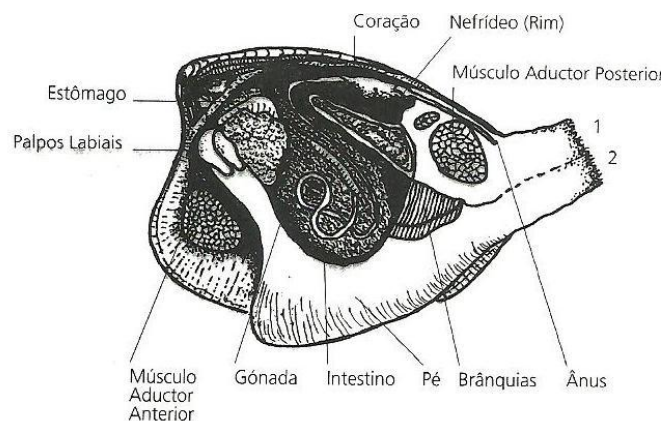


Figura 1.2.Anatomia da amêijoia *Ruditapes decussatus*

No habitat com temperaturas mais altas, os bivalves introduzem maior quantidade de água na cavidade paleal, conseqüentemente comem mais e consomem mais oxigênio.

Os moluscos bivalves podem ser capturados todo o ano, no entanto, apresentam-se mais desenvolvidos no outono e no inverno, e menos desenvolvidos durante e após a desova em março e abril, sendo as espécies consumidas pelo Homem recolhidas desde as zonas intermarés até poucos metros de profundidade (China *et al.*, 2003; Silvia & Batista, 2008).

1.2.3. Distribuição geográfica

A amêijoia *Ruditapes decussatus* é uma espécie de bivalve comercializada, principalmente, na Europa do Sul. Distribui-se desde o canal da Mancha, por toda costa atlântica e mediterrânica, até ao Norte de África (Figura 1.3) (Henriques,1998; FAO 2011)



Figura 1.3. Principais países produtores da *Ruditapes decussatus* (FAO,2011)

1.2.4. Habitat

As *Ruditapes decussatus* habitam nas praias das rias (vales submersos dos rios) e estão enterradas a uma profundidade inicial de 15-20cm, podendo atingir alguns metros. Para se enterrarem e efetuarem as deslocações utilizam o pé, um músculo muito elástico. Normalmente estas desenvolvem-se em concentrações salinas entre 30-35% (Henriques,1998; FAO 2011)

1.2.5. Parâmetros ambientais

Os seus parâmetros ambientais são semelhantes aos das ostras. A temperatura da água influencia o seu crescimento. No inverno, devido à diminuição da temperatura, o crescimento é bastante reduzido. Em contrapartida, na primavera e no outono o desenvolvimento é mais elevado. As amêijoas que ainda não atingiram a maturidade sexual crescem rapidamente no final de março e de novembro. As que já atingiram a maturidade, durante o verão apresentam uma diminuição de crescimento. No inverno,

como a temperatura das águas não desce demasiado, não compromete a sobrevivência das amêijoas (Henriques,1998).

As correntes de água e a exposição ao oxigénio são dois fatores muito importantes no crescimento das amêijoas. Quando as correntes de água são muito fortes podem constituir danos às amêijoas e às instalações onde elas crescem. Estas são ainda importantes uma vez que asseguram a renovação da água, facilitam a respiração e a distribuição do alimento. O crescimento das amêijoas é influenciado pelo período de tempo que estas estão submersas pela maré. O seu crescimento cessa quando as amêijoas estão expostas ao ar mais do que 35% do tempo (Henriques,1998).

1.2.6. Reprodução

As gónadas das amêijoas desenvolvidas em Portugal atingem a maturação entre os meses de abril a junho realizando a sua postura normalmente em julho. Pode ainda verificar-se um 2º ciclo reprodutivo no outono, se as amêijoas forem criadas em condições ambientais adequadas.

As gónadas acumulam reservas de glicogénio, durante a gametogénese que é metabolizado em ácidos gordos que conferem sabor às amêijoas. Por esse motivo, as amêijoas modificam de sabor no verão (Henriques, 1998).

Os seus sexos são separados, embora possam ser encontrados hermafroditas com pouca frequência.

As variações de peso, crescimento corporal, crescimento das gónadas e a desova dependem das condições ambientais, especialmente da disponibilidade de alimento. O ciclo gametogénico compreende duas fases: 1.ª fase de repouso (entre os meses de novembro e de dezembro) e 2.ª fase a gametogénese, que inclui a maturação (durante a primavera).

A desova ocorre entre os meses de junho e de agosto (Giese, 1969; Gabbott, 1976; Sastry, 1979; Bayne & Newell, 1983; Barber & Blake, 1985).

1.2.7. Captura

A captura é realizada através do desenterro, uma a uma com o auxílio de uma faca de mariscar ou simplesmente com os dedos. Os pescadores trazem as amêijoas para as estações de depuração, onde estas são mantidas em tanques durante pelo menos 42 horas. As amêijoas são, embaladas em sacos de rede entre 0,5 e 2kg, que são

destinadas para consumo fresco ou de conserva. Elas são transportadas por caminhões refrigerados, que mantêm a temperatura entre 3° e 10°C, tendo os moluscos, aproximadamente, uma vida útil de 5 dias.

Ruditapes decussatus é, frequentemente, cultivada com outros bivalves (*Venerupis pullastra*, *Venerupis rombóide*, *Venerupis aurea*, *Dosinia exoleta* e *Tellina encarnado*). Os seus principais predadores são: os caranguejos de costa (*Carcinus maenas*), estrelas-do-mar (*Asteria rubens* e *Marthasterias glacialis*), gastrópodes (*Natica sp.*), e aves (*Larus sp.*). Um *Carcinus maenas* (com cerca de 6,5 cm de largura) pode consumir 5-6 amêijoas por dia (Silva & Batista, 2008; FAO, 2011)

1.2.8. Produção de amêijoas em aquacultura

A maior parte das larvas da amêijoa-boia é recolhida da natureza. Não impedindo, as larvas podem igualmente ser produzidas em estações de produção de juvenis, onde a reprodução pode ser estimulada por choque térmico, pela adição de sémen ou pela libertação de gâmetas. Os ovos fecundados são filtrados através de peneiras e colocados em diferentes tipos de recipientes até atingirem o estágio larvar. Até à sua metamorfose, as amêijoas são alimentadas com microalgas (Comissão Europeia, 2013).

A amêijoa-boia pode ser cultivada em maternidades com sistemas de alimentação controlados que utilizam algas unicelulares. Em alternativa, pode ser cultivada em sacos de rede em mesas de cultura (Comissão Europeia, 2013).

As técnicas de engorda da amêijoa-boia exigem a manutenção regular do substrato. É necessário retirar as algas e os predadores (como caranguejos e estrelas do mar) e o substrato deve ser devidamente oxigenado. É importante que a densidade de amêijoas seja adequada. Antes de lançar as amêijoas, a zona deve ser preparada e limpa, de modo a não atrair predadores. As amêijoas são cobertas com rede, o que ajuda a protegê-las dos predadores. Na Europa, foi desenvolvida uma máquina que abre os sulcos na rede e, simultaneamente, lança as sementes. As redes devem ser limpas regularmente, a fim de evitar a incrustação de organismos, o assoreamento e a infiltração de predadores. Consoante a abundância de alimentos no meio, as amêijoas atingem os 40 mm em cerca de dois a três anos (Comissão Europeia, 2013).

1.3. Composição nutricional da amêijoia

Os bivalves são ricos em proteínas, vitaminas e minerais com um moderado valor calórico, em comparação com os outros produtos de origem animal. As amêijoas apresentam uma constituição pobre em gorduras. A gordura que possuem é rica em ácidos gordos, da família *n-3*. Por outro lado, relativamente aos minerais, estes são uma boa fonte de fósforo, potássio e sódio. Nas seguintes tabelas (1.2 e 1.3) é apresentada a composição nutricional por 100g de amêijoia crua (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2006).

Tabela 1.2. Composição nutricional dos macroconstituintes por 100g da amêijoia crua (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2006).

Componentes (g)	Por 100g
Água	81.1
Proteína	11.7
Gordura total	0.9
Total de Hidratos de Carbono disponíveis,	2.9
Amido,	2.6

Tabela 1.3. Composição nutricional dos minerais por 100g da amêijoia crua (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2006)

Componentes (mg)	Por 100g
Cinza (g)	1
Sódio	244
Potássio	78
Cálcio	51
Fósforo	178
Magnésio	103
Ferro	8.5
Zinco	2.1

1.3.1. Humidade

A amêijoia é constituída por 81.1% de água (Tabela 1.2). Esse valor percentual varia com a espécie, a época do ano, a idade, o sexo e o valor nutricional. Porém, existe uma

relação inversa bem caracterizada entre os teores de humidade e os lípidos, assim como entre a água e a proteína com menor intensidade.

A humidade apresenta uma função de transporte dos componentes nutritivos e de produtos metabolizados, além de participar na manutenção do equilíbrio de eletrólitos e no controlo da pressão osmótica (Ogawa & Maia,1999)

1.3.2. Proteínas

Como a maioria dos alimentos de origem animal, os frutos do mar contêm proteínas com um excelente valor nutritivo (Nettleton, 1984; Pigott & Tucker 1990). A proteína do pescado contém todos os aminoácidos essenciais, sendo altamente digerível (Jhaveri *et al.*, 1982).

As proteínas são consumidas para se obter os aminoácidos. A proteína é digerida ou hidrolisada em aminoácidos livres, que são absorvidos a partir do trato intestinal e distribuído pelo sangue para os órgãos e tecidos. Estes aminoácidos são utilizados por vários tecidos da amêijoas para sintetizar novas proteínas. Um consumo regular de proteínas ou aminoácidos é necessária porque os aminoácidos são utilizados continuamente pelo pescado, ou para a construção de novas proteínas durante a fase de crescimento e reprodução ou para substituir as proteínas existentes (manutenção). Uma dieta inadequada, pobre em proteínas, pode resultar na redução ou cessação do crescimento e perda de peso. Isto ocorre devido à utilização das proteínas dos tecidos menos vitais para a manutenção das funções dos tecidos mais vitais. Por outro lado, uma dieta com um elevado fornecimento de proteínas, apenas uma parte destas será utilizada para fazer novas proteínas, sendo as restantes convertidas em energia (Wilson, 2002).

As funções mais importantes das proteínas no organismo humano estão relacionadas com seu papel estrutural no revestimento externo (pele e pelos); na constituição da matéria contráctil dos músculos e da matéria conjuntiva, cartilagíneas e óssea; com a ação catalítica, pela constituição das enzimas que permitem a efetivação e a estabilidade das reações químicas internas; a formação de anticorpos; a formação de hormonas; e o transporte de diversas substâncias no interior do organismo, em particular, os lípidos (Ferreira,1994).

O marisco contém um excelente valor nutritivo de proteínas (Nettleton,1985; Pigott & Tucker,1990). As proteínas do pescado contém todos os aminoácidos essenciais, e são altamente digeríveis (Jhaveri *et al.*, 1984). As necessidades diárias de proteínas, para os adultos, variam entre 0,8 a 1g por kg de peso desejável (Almeida & Afonso, 2001).

1.3.3. Lípidos

Os lípidos dos animais marinhos possuem um elevado grau de instauração ao nível dos ácidos gordos, diretamente relacionados com a fluidez da membrana a baixas temperaturas (Ackman,1983). Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) essenciais ao organismo humano encontram-se nos lípidos marinhos. Alguns ácidos gordos de cadeia n-3, tais como o ácido *linolénico* (18:3n-3), ácido *eicosapentaenóico* (20:5n-3) e ácido *docosaheptaenóico* (22:7n-3), são abundantes em lípidos marinhos (Sargent, 1978; Sargent *et al.*, 1988; Chu & Greaves,1991).

Estes ácidos gordos são benéficos para o sistema cardiovascular. O ácido linolénico é fundamental para a formação de prostaciclina, que também são compostos eicosanóides. São sintetizadas pelas paredes dos vasos sanguíneos e são potentes inibidores da agregação plaquetária, dificultando a coagulação do sangue. Os tromboxanos e as prostaciclina têm, portanto, efeitos antagónicos. (Flecher, 1989; Almeida & Afonso, 2001)

O teor de lípidos da maioria do marisco é geralmente entre 1-2%, embora valores baixos como 0,5% não serem incomuns e valores de 3% tem sido descritos na literatura. A razão básica para o baixo nível de lípidos é que os bivalves armazenam o seu excedente de energia ou como reserva de glicogénio e não como depósito de gordura, enquanto os crustáceos e cefalópodes têm glândulas digestivas, onde a gordura pode ser armazenada temporariamente (Ackman, 1995).

Na produção dos bivalves os lípidos têm um papel importante, uma vez que fornecem, durante o inverno, energia para as condições de crescimento quando as reservas de hidratos de carbono se encontram esgotadas (Beninger & Lucas, 1984).

Nos bivalves, a variação sazonal dos lípidos está diretamente relacionada com a atividade reprodutiva (Giese, 1969; Gabbott, 1976; Sastry, 1979; Bayne & Newell, 1983; Barber & Blake, 1985).

Em geral, a energia é armazenada antes da gametogénese, quando o alimento é abundante, sob a forma de glicogénio, lípidos e proteínas. A importância destes substratos, onde eles são armazenados e a época da sua utilização que varia entre espécies (bem como entre populações da mesma espécie), mostraram que os ciclos de armazenamento de energia e de produção podem estar intimamente ligados no tempo.

Os fatores ambientais desempenham, aparentemente, um papel dominante na determinação de eventos nos ciclos de armazenamento (Giese, 1969; Gabbott, 1976; Sastry, 1979; Bayne & Newell, 1983; Barber & Blake, 1985).

1.3.4. Minerais

Os bivalves, como outros organismos vivos, contêm mais de 90 elementos naturais. A elevada proporção dos seus corpos consiste em carbono, hidrogénio, azoto, oxigénio e enxofre. Contêm, ainda, macro minerais tais como: o cálcio, magnésio, fósforo, sódio, potássio e cloreto que estão presentes em grama por quilograma (g/Kg). Os restantes elementos encontram-se no organismo a concentrações mais baixas (mg ou µg/Kg). As técnicas modernas de análise como a espectroscopia de absorção atómica, a ativação de neutrões, e a espectrometria de emissão atómica por plasma acoplados indutivamente permitem a análise exata destas substâncias em níveis, aproximadamente, de 10^{-7} a 10^{-9} g.

Os minerais são classificados como essenciais, não-essenciais e tóxicos. A maioria destes elementos é detetada em bivalves, o que inevitavelmente fornece macro e micro minerais (cobre, crómio, ferro, selénio, zinco, flúor e molibdénio) essenciais para a dieta humana (Ruiter,1994).

Os organismos aquáticos absorvem os minerais através da sua alimentação e da água circundante, que são depositados no tecido esquelético, músculo e diferentes órgãos (Lall,1989). Os peixes e mariscos contêm maiores concentrações de selénio do que as aves e as carnes vermelhas (Ruiter,1994).

A concentração dos minerais nos bivalves é influenciada por inúmeros fatores como as estações do ano, diferenças biológicas (espécie, tamanho, idade, sexo e maturidade sexual), fontes de alimentação, ambiente marinho (composição química da água, salinidade, temperatura e contaminantes) e o método de processamento do alimento. Muitos organismos aquáticos acumulam e retêm os minerais através do meio ambiente. No entanto, a sua incorporação é altamente seletiva (Lall,1989).

1.3.4.1. Fósforo

O fósforo é um dos elementos mais abundantes no pescado, nos humanos e em outros organismos vivos. As amêijoas contêm cerca de 178mg/100g de fósforo (Tabela 1.3).

O fósforo tem duas funções primordiais: é constituinte dos ossos e dos dentes e participa no metabolismo energético. O fósforo é um elemento essencial na manutenção do

equilíbrio ácido-base e intervém nas ações enzimáticas, no estado dos fosfatos minerais e dos pirofosfatos, e na degradação e utilização dos hidratos de carbono e dos ácidos gordos (Ferreira,1994; Almeida & Afonso, 2001).

As necessidades deste mineral encontram-se acrescidas em condições fisiológicas como a gravidez e o aleitamento materno. A ingestão diária recomendada de fósforo entre os 11 e os 24 anos de idade, no sexo feminino e masculino, é de 1200mg (Almeida & Afonso, 2001).

1.3.4.2. Potássio

O potássio é o principal catião no meio intracelular. Desempenha um importante papel na maior parte das funções vitais tais como o metabolismo celular (regulação do conteúdo de água), a síntese proteica e de hidratos de carbono (ativação dos sistemas enzimáticos) e a excitabilidade neuromuscular. Pensa-se que o potássio tenha, também, um papel na preservação da hipertensão arterial por ser antagónico ao sódio. O potássio pode também modificar as propriedades mecânicas e elétricas do coração, reduzindo a frequência cardíaca e prevenindo situações de taquiarritmias ventriculares (Almeida & Afonso, 2001).

A sua concentração média na amêijoia é de 78mg/100g (Tabela 1.3). As necessidades em potássio estão aumentadas nos seguintes casos: durante o período de crescimento e em caso de perdas digestivas (diarreia, fístulas). A ingestão diária recomendada de potássio em pessoas com idade superior a 10 anos é de 2000mg (Almeida & Afonso, 2001).

1.3.4.3. Sódio

O sódio é o principal catião do meio extracelular. O sódio é importante na regulação osmótica, equilíbrio ácido - base quando associado ao cloro, sob a forma de cloreto de sódio. Tem como principal função, a manutenção da pressão osmótica do meio extracelular evitando assim uma perda excessiva de água. Também é importante para transmissão eletroquímica no músculo e permeabilidade celular (Langston & Bebianno, 1998; Almeida & Afonso, 2001).

A amêijoia possui cerca de 244mg/100g de sódio (Tabela 1.3). As necessidades do sódio aumentam com a idade mas não existem diferenças entre os sexos. A ingestão diária recomendada de sódio em pessoas com idade superior a 10 anos é de 500mg (Almeida e Afonso, 2001).

A maioria do marisco tem concentrações de sódio na gama de 120 – 400mg/100g (Thurston & Osterhaug, 1960; Dyer *et al.*,1977; Sidwell *et al.*,1978; Teeny *et al.*,, 1984)

1.4. Contaminantes

1.4.1. Metais Pesados

As maiorias dos micro-minerais são essenciais à vida. Alguns destes minerais são fundamentais em elevadas concentrações no organismo mas exigem um baixo consumo dos mesmos, como o caso do cobre e do flúor. Os elementos mais referenciados são o iodo e o selénio. Estes elementos são ainda caracterizados pela sua não-toxicidade para ao meio ambiente.

Uma situação diferente aplica-se aos metais pesados como chumbo, cádmio e o mercúrio, uma vez que não demonstram nenhuma função essencial á vida. São classificados como minerais não-essenciais e, devido à sua toxicidade, são considerados elementos prejudiciais.

A poluição por metais pesados ocorre através de emissões que poluem principalmente águas superficiais nas áreas terrestres e, secundariamente, águas marinhas (Ruiter, 1994).

A contaminação por metais pesados é uma grande preocupação nos ecossistemas marinhos e costeiros, uma vez que estes, mesmo em baixa concentração, provocam a deterioração do ambiente, afetando assim os organismos que habitam nessas áreas. Os metais pesados podem acumular-se em espécies aquáticas, tais como os bivalves, em concentrações muitas vezes mais elevadas do que as concentrações na água e nos sedimentos. Este facto deve-se à sua capacidade para realizar filtragem de grandes quantidades de partículas, incluindo contaminantes, a partir da água do mar, sedimentos ou alimentos. Os bivalves devido à sua capacidade de acumular metais no ambiente, têm sido utilizados como indicadores da sanidade dos oceanos, em todo o mundo (Langston & Bebianno, 1998; Metian *et al.*, 2009).

Assim, *Ruditapes decussatus* tem sido utilizada, com sucesso, como monitor biológico das pressões antropogénicas, nomeadamente poluição de metais (Roméo & Gnassia-Barelli,1997; Smaoui-Damak, 2009; Serafim e Bebianno, 2010; Ramos-Gómez *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Atualmente, a regulamentação da União Europeia (Regulamento nº 1881/2006) refere três metais considerados perigosos para o consumo humano: chumbo, cádmio e mercúrio.

Em geral, todos estes metais apresentam uma toxicidade aguda, apesar de rara, associada a exposições a níveis muito elevados do metal, ou crónica, associada a períodos prolongados de exposição ao metal. O chumbo tem tendência para provocar lesões ao nível do sistema nervoso central, podendo produzir danos irreversíveis no cérebro, o cádmio acumula-se normalmente nos rins e no fígado, com possíveis consequências também irreversíveis. Inicialmente, em Portugal, a monitorização dos metais pesados era efetuada apenas com base no teor de mercúrio. No entanto, tornou-se evidente que a análise de apenas um metal seria insuficiente e, por isso, a partir do ano 2003 também o chumbo e o cádmio foram incluídos no programa nacional de controlo (Liang *et al.*, 2004; Tapia *et al.*, 2010).

1.4.1.1. Cádmio

O cádmio (Cd), é um micro-mineral não-essencial, vulgarmente detetado em ambientes aquáticos e terrestres. Estes são libertados através de fontes naturais, tais como atividades vulcânicas ou de lixiviação de solos e atividades de impacto humano como por exemplo, mineração, galvanoplastia, produção e utilização de pigmentos e baterias de níquel-cádmio (Crompton, 1997; Bargagli, 2000).

O cádmio é biopersistente e tende a acumular-se no organismo. Uma vez absorvido pelo organismo, pode permanecer nele por muito tempo (o seu tempo de semi-vida nos rins e fígado em humanos foi estimado entre 6 a 38 anos e entre 4 a 19 anos, respetivamente) (ASAE, 2009).

No Homem, a absorção de cádmio varia, em média, entre 3 a 8% do total ingerido, sendo favorecida por dietas deficientes em cálcio, em ferro e em dietas pobres em proteínas. A exposição continuada a cádmio pode resultar em lesões a diversos níveis, nomeadamente no pâncreas, testículos, tiroide, ossos, fígado e rins, sendo estes últimos os principais órgão-alvo da sua ação tóxica (ASAE, 2009).

Em organismos marinhos, os seus efeitos têm sido documentadas, especialmente nos moluscos bivalves, desde os anos 80. Um dos seus efeitos é a inibição do ADP (adenosina difosfato) estimulador da respiração mitocondrial e que reduz a eficiência do acoplamento (Sokolova, 2004). O seu valor admissível é de 1.0 mg/kg de peso fresco segundo o Regulamento nº 1881/2006.

Este metal está envolvido também na desregulação do sistema endócrino, causando interferência na reprodução da *Ruditapes decussatus* (Ketata, 2007). Esta espécie de amêijoia é conhecida por acumular cádmio nos seus tecidos e é um bioindicador para avaliar a contaminação do meio aquático. A acumulação do Cd na *R. decussatus* depende da concentração, do tempo e do tipo de tecido. O Cd acumula-se, principalmente, nas brânquias e é transportado para as glândulas digestivas onde se acumula continuamente.

A eliminação do Cd como a sua acumulação depende do tecido, seguindo a sequência da glândula digestiva e dos tecidos remanescentes. A semi-vida estimada do Cd para a concentração nas brânquias e nas glândulas é de 45 dias a 55 dias (Smaoui-Damak *et al.*, 2006; Bebianno & Serafim, 1998).

Na *R. decussatus*, o cádmio facilita a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e, conseqüentemente, estimula o processo de peroxidação lipídica através da oxidação de ácidos polinsaturados (Serafim & Bebianno, 2007). Portanto, as respostas das enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutase), CAT (catálase) e GPx (glutaciona peroxidase) são induzidas nas brânquias. A oxidação de proteínas e a degradação de proteínas na *R. decussatus* ocorre após a exposição ao Cd (Geret *et al.*, 2002; Chora *et al.*, 2008). O Cd altera também o metabolismo mitocondrial, a permeabilidade da membrana, a fosforilação oxidativa e inibe a síntese da proteína, através da sua ligação a bases de ácido nucleico, modificando a sua estrutura (Serafim & Bebianno, 2007).

1.4.1.2. Chumbo

O chumbo é um contaminante ambiental ubíquo e tóxico para a maioria dos seres vivos quando expostos a elevadas concentrações. As principais vias de emissão e exposição, incluem as emissões de combustíveis através dos escapes dos automóveis, indústrias de extração petrolífera, tintas e corantes, baterias, cabos e tubulações (Klein, 2005).

Os bivalves em particular, absorvem chumbo a partir da água contaminada, especialmente em estuários contaminados com águas residuais urbanas e industriais. O chumbo encontra-se geralmente em maiores concentrações nos moluscos do que nos peixes (Ruitter, 1995). Segundo o Regulamento nº1881/2006, o teor máximo admissível de chumbo nos moluscos bivalves é cerca de 1.5mg/kg peso fresco.

A sua absorção depende do estado físico e químico do metal, bem como da idade e estado fisiológico e nutricional do organismo. Os indivíduos com certas deficiências de macronutrientes e micronutrientes são propensos a uma maior taxa de absorção de

chumbo. Isto é, a carência de ferro, zinco e cálcio pode promover a absorção de chumbo através do trato gastrointestinal (Goyer & Clarkson, 2001; Klein, 2005). Por sua vez, os adultos podem normalmente absorver cerca de 15% do total de chumbo ingerido, enquanto as mulheres grávidas e crianças podem absorver até 3,5 vezes esse valor (Klein, 2005).

Talvez devido à sua maior absorção, as crianças são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do chumbo. Os efeitos do chumbo na circulação sanguínea dependem da sua concentração. Os órgãos considerados críticos, considerando a toxicidade do chumbo, são os órgãos constituintes do sistema nervoso, a medula óssea e os rins. Nas crianças pode provocar diminuição do quociente de inteligência e impede o crescimento físico (US Food & Drug Administration, 1992; Klein, 2005). Os sintomas de encefalopatias derivadas da exposição a este elemento incluem letargia, vômitos, fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, perda de apetite, disfunção cognitiva e tonturas que evoluem para ataxia e perda de consciência e, em situação extrema, coma e morte (Goyer e Clarkson, 2001; Klein, 2005). Verificam-se também efeitos hematológicos, como anemia, nefropatias, imunotoxicidade, carcinogenicidade, entre outros. Destacam-se ainda as dores musculares, proteinúria, aminoacidúria, cólicas, constipação intestinal ou diarreia, arteriosclerose precoce com alterações cerebrovasculares e hipertensão, entre outros (Goyer & Clarkson, 2001; Klein, 2005).

1.4.2. Parâmetros microbiológicos

Em geral, a degradação microbiológica do pescado é mais acelerada do que a da carne. Isto ocorre devido à humidade e ao pH do pescado ser mais elevado do que o da carne, o que proporciona o crescimento das bactérias.

Devido às baixas temperaturas do meio marinho, a flora bacteriana inclui uma grande proporção de bactérias psicrófilas, comparada com a flora da carne (Harrigan,1998).

As bactérias responsáveis pela degradação do marisco são as mesmas responsáveis pela degradação do peixe de água salgada. Estas provêm de esgotos, de habitats estuarinos e costeiros, e pode resultar na concentração de organismos do intestino humano, que podem incluir patogénicos tais como a *Salmonella* e vírus entéricos. Portanto, a indicação da poluição fecal é determinada através da presença ou ausência de *E. Coli* e pela contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios (Harrigan,1998).

A contaminação dos bivalves ocorre principalmente pela acumulação de microrganismos patogênicos e toxinas durante alimentação por filtração (Lees, 2000; Ripabelli *et al.*, 1999).

A contaminação de bivalves por microrganismos prejudiciais apresenta certos riscos que estão relacionados com o seu processo de cozedura tradicional. Normalmente os bivalves são apresentados mal cozidos ou crus, o que pode não ser suficiente para garantir a segurança do consumidor (Ripabelli *et al.*, 1999; Lees, 2000; Canesi *et al.*, 2001, Chironna *et al.*, 2002; Formiga-Cruz *et al.*, 2003; Zampini *et al.*, 2003). Estima-se que 1 em 2000 refeições confeccionadas desta forma resulta em doenças intestinais, considerando o marisco um dos alimentos mais perigosos (Murphree e Tamplin, 1995; Gillespie *et al.*, 2001).

Para um melhor controlo de risco de doenças associados aos bivalves, é necessário uma análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) em conjunto com o ambiente criado com a qualidade da água de cultivo e áreas de colheita e com o processamento dos produtos pós-colheita (depuração e ou tratamento de calor) (WHO,2010).

O risco de doença ou morte devido ao consumo de marisco contaminado é inerente a todos os consumidores. A população de alto risco corresponde a indivíduos com distúrbios imunossupressores (cancro, pacientes de HIV), acloridria, epilepsia, diabetes *mellitus*, doença renal crónica e dependentes de esteroides). Outros fatores que aumentam a ocorrência de doenças relacionadas com consumo de bivalves são a gravidez, faixa etária e o excesso de álcool (Butt,2004; Ripabelli *et al.*, 1999).

A condição ambiental é outro fator que influencia a contaminação dos bivalves na água do mar. Burkhardt e os seus colegas (1992) mostraram que a probabilidade de sobrevivência de *V. vulnificus* na água do mar é reduzida quando a temperatura não regista o intervalo de 13 a 22°C e quando a salinidade é superior a 25 ppt (Burkhardt, 1992).

A variação anual da temperatura da água, o estado fisiológico e a salinidade afetam a capacidade de acumulação de espécies microbianas por parte dos bivalves. Kaspar e Tamplin (1993) referem que os moluscos bivalves possuem maior capacidade de acumulação de espécies microbianas durante certos períodos na primavera, com temperaturas variadas entre 11,5 e 21,5°C.

Além disso, as variações inter e intra-espécie de bivalves é determinada pela quantidade de água filtrada - entre vinte a cem litros de água por dia - independentemente das condições ambientais (Richards, 1988; Robertson, 2007). Isto significa que a alimentação fisiológica dos bivalves determina a acumulação de microrganismos patogênicos (Burkhardt & Calci, 2000; Ho & Tam, 2000). Estes fenómenos explicam parcialmente as diferenças sazonais e geográficas no teor microbiano de bivalves (Hernroth *et al.*, 2002).

Geralmente, as infeções alimentares estão relacionadas com vírus presentes no marisco. Em contrapartida, as hospitalizações e/ou mortes estão relacionadas com bactérias (Burkhardt *et al.*, 1992).

Sagoo e os seus colegas mostraram que, durante o ano de 2003, no Reino Unido, 4% de 682 lotes de retalho de bivalves e de produção local foram insatisfatórios devido à presença de níveis elevados de *Escherichia coli* (3,3%, 102 a 106 UFC/g), *V. parahaemolyticus* (0,4%; 102-106 ufc/g) e *Staphylococcus aureus* (0,3%; > 103 ufc/ g) (Sagoo *et al.*, 2007).

1.4.2.1. *Escherichia coli*

A família das *Enterobacteriaceae* consiste em bactérias Gram negativas, anaeróbios facultativos e não esporulados (Brenner, 1984).

As *Enterobacteriaceae* podem ser encontradas no solo, na água, na vegetação e no trato intestinal dos animais. A análise efetuada aos alimentos, aos ingredientes e às matérias-primas é realizada pela presença de grupos de marcadores, tais como os coliformes totais, ou *Enterobacteriaceae*. Este teste é dos mais comuns no laboratório de microbiologia alimentar, em parte devido à relativa facilidade e rapidez com que os testes podem ser realizados. Estes testes conseguem afirmar se o alimento foi processado corretamente em questões de segurança alimentar. A presença de *Enterobacteriaceae* indica se ocorreu uma falha do processo ou pós-processo (Mossel, 1982).

A *Escherichia coli* é uma bactéria que se distribui, principalmente, nos intestinos de crianças e de adultos saudáveis, assim como em mamíferos. A sua presença nos alimentos, na água e em testes ambientais indica que existe contaminação fecal e possível presença de patogênicos entéricos. Normalmente, estas bactérias têm a função de supressão do crescimento de espécies bacterianas perigosas e sintetizam uma quantidade apreciável de vitaminas (US Food & Drug Administration, 1992; Veigas, 2009).

Contudo, uma minoria de estirpes é capaz de causar doença por diferentes mecanismos. Existem quatro estirpes de elevado grau patogénico, nomeadamente a estirpe enterotoxigénica (ETEC), a estirpe enteropatogénica (EPEC), a estirpe enterohemorrágica (EHEC) e a estirpe enteroinvasiva (EIEC) (US Food & Drug Administration, 1992).

A estirpe enterotoxigénica (ETEC) causa uma gastrite autolimitada (também conhecida como "diarreia dos viajantes"). A ETEC não é considerada problemática em países desenvolvidos (US Food & Drug Administration, 1992).

A estirpe enteropatogénica (EPEC) provoca diarreia aquosa ou sanguinolenta, provocando alterações físicas no intestino e comprometendo a sua integridade. A patologia causada pela estirpe EPEC é também denominada "diarreia infantil" (US Food & Drug Administration, 1992).

A estirpe enterohemorrágica (EHEC) provoca fortes dores abdominais e diarreia aquosa que se pode tornar sanguinolenta. A doença é também conhecida por colite hemorrágica (US Food & Drug Administration, 1992).

A estirpe enteroinvasiva (EIEC) atua invadindo as células epiteliais do intestino causando uma forma moderada de disenteria. É caracterizada pela presença de sangue e muco nas fezes. É também conhecida por disenteria bacilar (US Food & Drug Administration, 1992).

1.4.2.2. *Salmonella*

As *Salmonellas* são bactérias mesófilas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e existem mais de 200 sero-variedades, 50 das quais são predominantemente associadas a fontes humanas ou animais. Este agente patogénico apresenta um elevado grau de resistência quando exposto a uma grande variedade de fatores de *stress*, o que lhes proporciona uma capacidade elevada de persistência em mudança ambientais (Brands et al., 2005; Setti *et al.*, 2009).

As *salmonelas spp.* são responsáveis pelas principais doenças gastrointestinais. Estas encontram-se praticamente em todo o género alimentício cru, nas águas, nas fezes e em todo o tipo de superfícies.

O género *Salmonella*. contém várias estirpes patogénicas podendo causar gastrites moderadas (na grande maioria) e febre tifoide (*S. typhi*).

As manifestações clínicas aparecem entre 7 a 28 dias a seguir à exposição a estas bactérias. Pode ocorrer diarreia aquosa, obstipação, febre persistente ou picos febris, dores abdominal e de cabeça, náusea, vômitos, prostração e erupções cutâneas ou pontos vermelhos nos ombros, tórax ou abdômen. As complicações mais graves são a hemorragia intestinal, o desenvolvimento de úlceras no íleon ou a perfuração intestinal. As manifestações clínicas da síndrome de gastroenterite/enterocolite, que é provocado por estirpes não tifoides, incluem náuseas, cólicas abdominais, diarreia com água e fezes mucoides com sangue, febre de pouca duração (< 48 horas) e vômitos 8 a 72 horas após a exposição à bactéria. Os sinais clínicos geralmente diminuem por volta do 5º dia, seguindo-se um estado de convalescença que varia de um a vários meses durante o qual o indivíduo assintomático continua a excretar *Salmonella*. Esta infecção não confere à pessoa doente imunidade. A enterocolite não-tifoide pode progredir para septicemia devido à migração desta bactéria do trato intestinal para os tecidos mais profundos através da circulação sanguínea e linfática, podendo levar a anomalias cardíacas e circulatórias, infecção intracraniana e disfunção de órgãos (US Food & Drug Administration, 1992; Viegas, 2009).

A dose que é infetada pode ser de 15 a 20 células dependendo da idade, do estado de saúde do hospedeiro e das diferenças entre os serotipos. A gravidade dos sintomas depende de fatores como a dose ingerida e as características da bactéria. Todas as pessoas são suscetíveis a estes agentes. Contudo, existem grupos mais vulneráveis como idosos, crianças e pessoas portadoras de doenças, onde os sintomas desenvolvidos podem ser mais graves. Os doentes portadores de SIDA têm uma maior suscetibilidade (cerca de 20 vezes mais) do que a população em geral e sofrem de episódios recorrentes (US Food & Drug Administration, 1992; Viegas, 2009)

A *Salmonella* é responsável pela ocorrência de mais surtos de doenças transmitidas por alimentos do que qualquer outra bactéria (Popoff *et al.*, 2004).

A maior parte dos relatórios indica que o pescado é um veículo de *Salmonella* muito menos frequente do que outros produtos alimentares e que o peixe e os mariscos são responsáveis apenas por uma pequena percentagem do número total de casos de *Salmonella* referidos nos Estados Unidos e noutros países (Ahmed, 1991). Um relatório sobre a incidência de salmonelose ao longo de um período (1988-1992) nos Estados Unidos mostrou que 7,4% dos surtos foram associados com o consumo de peixe ou marisco (Bean *et al.*, 1997). O isolamento de sorotipos de *Salmonella* de moluscos vivos

dos ambientes marinhos tem sido relatado a partir da região da Galiza de Espanha (Martinez- Urtaza *et al.*, 2003).

1.4.2.3. *Vibrio sp.*

O género *Vibrio* é composto por bactérias Gram-negativas, oxidase positivas, anaeróbias facultativas e móveis. Em geral o seu crescimento é favorecido pela presença de NaCl, embora essa necessidade varie entre as espécies (Sousa,1999; China *et al.*, 2003; WHO, 2008).

O género *Vibrio* é abundante no meio aquático, especialmente, em águas com temperaturas a rondar os 10°C. São muito sensíveis ao calor, e não sobrevivem a temperaturas de cozedura. Não estão, geralmente, associados à contaminação fecal como os índices de coliformes e coliformes fecais. Alguns *vibrios* causam doenças no Homem assim como em vertebrados e invertebrados marinhos, como peixes enguias e moluscos (Oliver, 1989; US Food & Drug Administration, 1992).

Na microflora do ambiente marinho existem várias espécies de *Vibrio*, que incluem organismos patogénicos para os seres humanos. As espécies responsáveis pela maioria das infecções alimentares por *Vibrio* são: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* (Wallace *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2000; Croci *et al.*, 2001).

As duas características que identificam epidemicamente a *V. cholerae* são a produção da toxina colérica e o serogrupo somático. Esta espécie tem um período de incubação que pode ir de algumas horas até 5 dias após a ingestão de alimentos ou de água contaminados. A doença típica é caracterizada por um súbito início de vómitos e de diarreia dolorosa. Após esta fase segue-se a supressão da função renal, sede, câibras abdominais e nas pernas, e colapso devido à marcada desidratação e desequilíbrio eletrolítico (Viegas, 2009). Os vómitos é uma manifestação clínica comum, ocorrendo algumas horas após o início da diarreia, da desidratação com eventual progressão para o estado de choque e morte.

A *V. parahaemolyticus* é responsável pela gastroenterite ligada ao consumo de bivalves, podendo provocar casos isolados ou surtos. A doença inicia-se de um modo agudo com diarreia marcada e dores abdominais que cedem espontaneamente no espaço de 48 a 72 horas. O período de incubação varia de 8 a 72 horas, com uma média de 18 horas. Outros sintomas, em frequência decrescente, incluem náuseas, vómitos, dor de cabeça, febre baixa e calafrios. O organismo desencadeia danos na mucosa da garganta e ulceração no cólon; Para além disso, o organismo e leucócitos fecais são encontrados

nas fezes. A mortalidade é baixa ocorrendo só em casos mais suscetíveis como em idosos e doentes debilitados. Pode ocorrer, ocasionalmente, uma forma disentérica grave e diarreia sanguinolenta, sendo a maioria dos casos tratados com terapia de suporte como a reidratação (Viegas, 2009).

Parece existir uma sazonalidade associada aos meses mais quentes (entre maio e agosto), uma vez que é nesse período que ocorrem mais casos de intoxicação (Deepanjali *et al.*, 2005)

A ingestão de bivalves contaminados com *V. vulnificus* causa gastroenterites, a síndrome designada por "septicemia primária". Os indivíduos com diabetes, cirrose, leucemia, ou que se encontrem sob o efeito de medicamentos imunodepressores ou esteróides são especialmente suscetíveis.

Normalmente, dentro das 24 horas após a ingestão em hospedeiros susceptíveis a taxa de mortalidade excede os 50%. O período de incubação varia de 7 horas a alguns dias. Os sintomas mais comuns incluem febre, calafrios, náusea e hipotensão. Os sintomas como dores abdominais, vômitos e diarreia são reportados como menos frequentes (U.S. Food and Drug Administratio, 1992; Sousa,1999; China *et al.*, 2003; WHO, 2008).

Para reduzir o risco de infecções provocadas pela *Vibrio spp.*, associado ao consumo de bivalves, o *U.S. National Shellfish Sanitation Program* (FDA, 2009) estabeleceu limites máximos tempo/temperatura para a exposição dos bivalves desde a colheita até à refrigeração ($\leq 10^{\circ}\text{C}$), dependendo da temperatura do ar máxima (Hood *et al.*, 1983).

Embora o crescimento da *Vibrio spp.* nos bivalves possa ser inibida pelas temperaturas de refrigeração, as bactérias podem multiplicar-se rapidamente uma vez que estes sejam expostos a temperaturas elevadas ($> 25^{\circ}\text{C}$) (Gooch,2002). Assim, manter os bivalves numa cadeia de frio por si só, ou seja, em refrigeração, pode não ser suficiente para eliminar o risco de infecção por *Vibrio*, associado ao consumo de bivalves crus.

Este processo de refrigeração demonstrou ser eficaz na redução de *Salmonella*, *Esherichia coli* e coliformes totais, mas não para a eliminação de *Vibrio spp.* em marisco (Vasconcelos & Lee,1972; Son & Fleet, 1980; Eyles & Davey,1984; Timoney & Abston, 1984).

1.5. Estabilidade dos bivalves

A frescura do pescado e do marisco depende essencialmente da avaliação sensorial dos atributos de frescura, como exemplo a textura, o cheiro e a cor (Pacquit *et al.*, 2005).

Os métodos de avaliação têm de ser, preferencialmente, objetivos, de baixo custo, rápidos, confiáveis e não-destrutivos. Os métodos típicos incluem análises sensoriais (odor, sabor e textura); análises microbiológicas (contagem total de microrganismos); análise das propriedades físicas (pH, tensão das fibras musculares, viscosidade e textura) e análises químicas com determinação de azoto básico volátil total e índice do ácido tiobarbitúrico e histamina (Ogawa & Maia,1999;Pacquit *et al.*, 2005)

1.5.1. pH

Após a morte do pescado o transporte de oxigénio ao músculo é interrompido, e inicia-se que uma nova via de produção de energia. (Huss,1995). A glicólise anaeróbia resulta na acumulação de ácido láctico, o que que reduz o pH do músculo. Em geral, o músculo do pescado contém um nível de glicogénio relativamente baixo, em comparação ao dos mamíferos. Assim, depois da morte forma-se menor quantidade de ácido láctico, pelo que o valor de pH não decresce muito. Os valores de pH de espécies marinhas e de aquacultura, *post mortem*, por norma encontram-se no intervalo 6,1 - 6,5. Também o valor nutricional, a condição física e o *stress* anterior à morte têm efeito nos níveis de glicogénio armazenado e, conseqüentemente, no pH final do músculo após a morte (Huss,1995; Howgate, 2009).

A redução do pH do músculo do pescado após a morte tem efeito nas suas propriedades físicas e químicas. À medida que o pH decresce, ocorre uma desnaturação parcial das proteínas e estas perdem a capacidade de retenção da água, afetando a textura do músculo (Haard, 1992; Huss,1995). Assim, através do valor de pH no músculo do pescado podemos conhecer a sua condição de deteriorização. Este valor vai aumentando gradualmente durante o período de conservação, devido à formação de compostos químicos, em particular compostos azotados, como resultado das reações autolíticas e bacterianas (Huss,1995; Howgate, 2009; Gonçalves, 2010)

1.5.2. Azoto básico volátil total (ABVT)

Durante a conservação de pescado são produzidos compostos voláteis, que lhe conferem um cheiro desagradável, entre os quais se encontram os compostos azotados que são de grande importância, em especial a amónia e a trimetilamina (TMA) pois estas conferem cheiro tipo amoniacal e forte a peixe, típicos de pescado deteriorado (Huss,1995; Haard,1992; Gram & Huss, 1996). Estes compostos são resultantes das atividades autolíticas e bacterianas sendo que a TMA resulta da redução bacteriana do óxido de

trimetilamina (OTMA), cuja concentração varia entre 1 e 5% (em peso seco) nas espécies marinhas (Huss,1995).

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

O pescado em excelente estado de frescura, apresenta teores de ABVT entre 5 a 10 mg/100g de músculo; Por outro lado, o pescado com uma frescura razoável pode atingir teores de ABVT entre 15 a 25mg/100g de músculo. No início da degradação, o teor de ABVT pode atingir valores até 30 a 40mg/100g e, quando este se apresenta bastante degradado, o ABVT poderá atingir valores entre 50mg/100g (Ogawa,1999).

1.5.3. Rancidez oxidativa

Para a medição química de rancidez oxidativa, são utilizados valores de peróxido (PV) e o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA).

Inicialmente na rancidez oxidativa, o oxigénio reage com os lípidos insaturados, formando-se hidroperóxidos, decompondo-se em substâncias que conferem o sabor característico de ranço (Ogawa,1999).

A rancidez oxidativa consiste em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura1.4).

A iniciação consiste na formação dos radicais livres do ácido gordo devido à saída de um hidrogénio de carbono alílico na molécula de ácido gordo, em condições favorecidas pela luz e pelo calor. De seguida, na propagação, os radicais livres, susceptíveis ao ataque do oxigénio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes. Estes, não conferem qualquer sabor, mas podem levar ao aparecimento de colorações castanhas ou amarelas. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando num processo autocatalítico. Na terminação, os dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos

secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos. Esta oxidação secundária, conduz à formação de ácidos carboxílicos, alcanos, aldeídos, álcoois e cetonas, que originam diversos cheiros desagradáveis e, em alguns casos, uma coloração amarelada. Estes compostos têm um cheiro e um sabor forte a ranço. Um produto da degradação secundária, o malonaldeído, pode ser determinado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (Ramalho & Jorge, 2005)

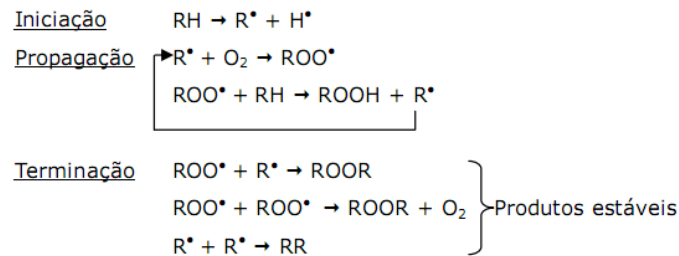


Figura 1.4. Esquema geral do mecanismo da rancidez oxidativa (Ramalho & Jorge, 2005)

O método do TBA é aplicável a produtos que contém teores de aldeído malónico até 10 mg/1000 g da amostra. A sacarose e alguns compostos do fumo da madeira podem interferir, aumentando o valor deste índice. O seu valor máximo admissível é de 4 mg/kg (NP 3356/1990).

1.6. Zonas de Produção (Classificação)

Para se garantir a qualidade sanitária das zonas de produção de moluscos bivalves e se obter uma estimativa do risco de contaminação por microrganismos patogénicos bacterianos e virais de uma determinada área foi implementada uma classificação que tem como base a avaliação das fontes de contaminação fecal, a proximidade da área e a monitorização de microrganismos indicadores (*Escherichia coli*) (Silva & Batista, 2008; China *et al.*, 2003).

Despacho N.º 14515/2010 da Presidente do Conselho Diretivo do Instituto Nacional Recursos Biológicos, I.P., e publicada no D.R. n.º 182, II Série, de 17 de Setembro classifica e zonas costeiras de produção de moluscos bivalves.

Os bivalves capturados na zona A podem ser apanhados e comercializados para consumo humano direto. Os bivalves provenientes da zona B podem ser apanhados e destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial. Os da

zona C podem ser apanhados e destinados a transposição prolongada ou transformação em unidade industrial. Na zona proibida não é autorizada a apanha de moluscos bivalves.

A classificação das zonas de produção de moluscos bivalves está baseada em critérios bacteriológicos (*Escherichia coli*) (Tabela 1.5)

Tabela 1.4. Classificação das zonas de produção de moluscos bivalves baseada em critérios bacteriológicos (*Escherichia coli*) (Despacho N.º 14515/2010)

Classe	Teor de <i>Escherichia coli</i> /100g	Observações
A	Inferior ou igual a 230	-
B	Superior a 230 e inferior ou igual a 4600	Pelo menos em 90 % das amostras e nenhuma exceder 46000.
C	Superior a 4600 e inferior ou igual a 46000	-
Proibida	Mais de 46000	-

1.7. Regras de higiene da venda de bivalves

Para garantir o cumprimento dos critérios microbiológicos adoptados pelo Regulamento (CE) nº 1019/2008, da Comissão de 17 de Outubro que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à higiene dos géneros alimentícios, os operadores do sector alimentar têm que assegurar que os bivalves vivos colocados no mercado para consumo humano cumprem determinadas regras específicas, designadamente as embalagens unitárias de bivalves vivos que devem permanecer fechadas depois de deixarem o centro de expedição até serem apresentados ao consumidor final ou serem utilizados numa unidade de restauração. Por outro lado, é proibido proceder à reimersão ou ao aspergimento dos moluscos bivalves vivos com água, depois de terem sido embalados para a venda no retalho e de terem saído dos centros de expedição.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral estudar o valor nutricional da amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*) produzida em aquacultura em três épocas do ano (inverno, primavera e verão), comparar as diferenças existentes entre épocas, e ainda avaliar as suas alterações bioquímicas e microbiológicas da amêijoia durante a conservação em refrigeração a $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Os objetivos específicos consistiram:

- a) Determinação os teores de humidade, proteína bruta, gordura total e teor de cinzas da amêijoia nas três estações do ano;
- b) Determinação o fósforo, sódio e potássio da amêijoia nas três estações do ano;
- c) Determinação de dois metais pesados (chumbo e cádmio) da amêijoia nas três estações do ano;
- d) Comparar o valor nutricional e os níveis de metais pesados das amêijoas de aquacultura produzidas em Portugal e noutros Países;
- e) Avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as amêijoas produzidas em diferentes estações do ano.
- f) Determinação do pH, teor de TBA e teor de ABVT em amêijoas conservadas em refrigeração à temperatura de 5°C durante 10 dias.
- g) Pesquisa de coliformes fecais/*E.coli*, *Salmonella* e *Vibro spp.* em amêijoas conservadas em refrigeração à temperatura de 5°C durante 10 dias.
- h) Estabelecer o tempo de vida útil das amêijoas em refrigeração a $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

3. Material e Métodos

3.1. Avaliação sazonal do valor nutricional e dos contaminantes ambientais

3.1.1. Amêijoa-boa

A amêijoa-boa (*Ruditapes decussatus*) (Figura 3.1) utilizadas para este trabalho foram provenientes de uma aquacultura situada na Ria Formosa (Algarve). A identificação da espécie foi realizada pelos técnicos de biologia marinha da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria.



Figura 3.1. Amêijoa-Boa (*Ruditapes decussatus*)

3.1.2. Dados biométricos

O estudo dos dados biométricos da amêijoa realizou-se através do peso total da amêijoa, do miolo e do seu comprimento. Para a análise do peso total mediu-se a amêijoa inteira e utilizou-se uma balança (Philips HR2391/00). A medição do comprimento foi realizada através do paquímetro (Figura 3.2.). Para calcular o peso do miolo, as amêijoas foram abertas e pesadas, individualmente, com auxílio da balança (Philips HR2391/00) (Figura 3.3



Figura 3.2. Medição da amêijoia-boia através do paquímetro



Figura 3.3. Pesagem da amêijoia-boia

3.1.3. Preparação da amostra da amêijoia boa

Para a avaliação nutricional das amêijoas foram realizadas três amostragens em diferentes épocas do ano, nomeadamente, no inverno de 2012, primavera e verão de 2013.

As amêijoas foram abertas, sendo retirada a parte edível de forma conveniente e homogeneizou-se a amostra na máquina picadora (Pikatti 700 W). As amostras foram separadas em dois lotes. O primeiro lote, constituído pelas amostras em que a análise se procedia de imediato, foi colocado na câmara de refrigeração (Beko) a uma temperatura aproximada de 5°C. O segundo lote, composto pelas amostras em que a análise era realizada nos dias seguintes, foi colocado na câmara de congelação (Beko) a uma temperatura aproximada -20°C.

3.1.4. Avaliação do valor nutricional

3.1.4.1. Teor de humidade

Fundamento do método:

A determinação do teor de humidade de acordo com a norma NP 2282/1991 e através do método de secagem pela estufa, consiste na secagem da amostra até obtenção da massa constante.

Equipamentos:

Para este trabalho utilizaram-se os seguintes equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g);
- Cadinho;
- Máquina de picar (Pikatti 700 w);
- Estufa de secagem a 105°C (Mettler);
- Exsicador.

Procedimento

As caixas de Petri foram colocadas numa estufa a 105±2°C durante a noite e foram colocadas a arrefecer num exsicador. Pesou-se 10g de amêijoas e colocou-se na estufa a 105±2°C até ao dia seguinte (Figura 3.4). Depois de se retirar da estufa, colocou-se a caixa de Petri no exsicador, deixou-se arrefecer e pesou-se novamente. Esta operação repetiu-se por períodos de 30 minutos até que os resultados das duas pesagens consecutivas não diferirem-se entre si mais do que 10mg.



Figura 3.4. Secagem da amostra em estufa

Tratamento de resultados

A humidade do produto expressa em gramas por 100g de amostra foi obtida pela seguinte equação:

$$\frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

m₁- massa do conjunto: cápsula, areia e vareta

m₂- massa do conjunto: cápsula, areia, vareta e da toma para análise

m₃- massa do conjunto: cápsula, areia, vareta e da toma para análise após a secagem

3.1.4.2. Teor proteína**Fundamento do método:**

A determinação do teor de proteína pelo método de Kjeldhal de acordo com a norma NP 2030:1996. Esta técnica tem como etapas (i) a digestão da amostra pelo ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador; (ii) a alcalinização dos produtos da reacção; (iii) a destilação; e (iv) a titulação do amoníaco libertado de modo a obter o teor de azoto.

Reagentes:

- Solução de ácido clorídrico 0.1M (Fisher Scientific)
- Ácido sulfúrico concentrado (Sigma Aldrich)
- Solução de hidróxido de sódio a 40% (Panreac)
- Solução de verde bromocresol (Merck)
- Solução de vermelho de metilo (Merck)
- Solução de ácido bórico a 4% (Panreac)
- Sacarose (Fisher Scientific)

Equipamentos:

- Tubos de digestão
- Cadinhos
- Provetas
- Digestor a 220°C e a 400 °C (2006 Foss)
- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Erlenmeyer
- Bureta
- Destilador (Kjeltec TM 2100 Foss)

Procedimentos

Pesou-se 0,5g de amostra num papel de filtro, dobrou-se o papel de filtro, de forma a evitar a perda de amostra, e introduziu-se num tubo de Kjeldahl.

Colocou-se duas pastilhas de catalizador no tubo e adicionou-se 20ml de ácido sulfúrico concentrado. Na digestão utilizou-se ácido sulfúrico concentrado de forma a ter lugar a libertação do azoto. Colocou-se o tubo no digestor a 220°C durante 30 minutos. Voltou-se a programar o digestor para 400°C durante 90 minutos. Deixou-se arrefecer o tubo. Destilou-se o azoto presente na amostra, agora convertido em amoníaco, destilado por arrastamento de vapor e recolhido numa solução de ácido bórico, que contém uma mistura de verde de bromocresol e vermelho de metilo (Figura 3.5). Titula-se o amoníaco com ácido clorídrico 0.1M.



Figura 3.5. Destilação por arrastamento de vapor e recolha do ácido bórico

Tratamento dos resultados

Obteve-se o teor de proteína bruta (PB) por multiplicação do teor em azoto total (NT) pelo fator (F) 6,25 ($PB = NT \times F$), de acordo com a equação seguinte:

$$\left[\frac{14 \times (Va - Vb) \times 0.1}{m} \right] \times 100$$

Va : Volume do titulante usado para amostra (ml)

Vb: Volume do titulante usado para o branco(m)

m- Massa da amostra (g)

O teor de proteína é expresso em g/100 g de parte edível.

3.1.4.3. Teor de gordura total

Fundamento do método:

O método Bligh-Dyer (1959) utiliza a mistura de três solventes, i) clorofórmio; ii) metanol e iii) água. A amostra é misturada com o metanol e clorofórmio que estão numa proporção que formam uma só fase com a amostra. Adiciona-se mais clorofórmio e água promovendo a formação de duas fases distintas, uma de clorofórmio, contendo lípidos, e outra metanol mais água, contendo substâncias não lipídicas. A fase do clorofórmio com a gordura é isolada e, após a evaporação do clorofórmio, obtém-se a quantidade de

gordura através da pesagem. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água).

Reagentes:

- Solução de metanol (Panreac) /clorofórmio (Scharlau) na proporção 2:1
- Clorofórmio (Scharlau)
- Cloreto de Sódio saturado 40% (Panreac)
- Água MiliQ (Fisher Scientific)
- Sulfato de sódio anidro (Panreac)

Equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Exsicador
- Rotavapor (*Heidolph Laborata 4000*)
- Balões Periformes de 10ml.
- Politron (*Ika T-18 Basic Ultra Turrax*)
- Ultra-sons (VWR Ultrasonic TM)
- Sistema de Vácuo (KNF Neuberger)
- Proveta de 50ml.
- Ampola de Decantação.
- Papel de filtro (Whatman n.º 1)

Procedimentos

Pesou-se 10g de amostra e colocou-se num gobelé. De seguida, adicionou-se 30mL de metanol: clorofórmio (2:1) e homogeneizou-se a mistura num Politron durante 5 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 4mL de solução saturada de NaCl e agitou-se continuamente, 10mL de clorofórmio e 10mL de água MiliQ e voltou-se a homogeneizar durante 5 minutos. Colocou - se o produto homogeneizado no banho de ultra-sons durante 5 minutos. De seguida, filtrou - se o preparado no sistema de vácuo e transferiu-se o filtrado para uma ampola de decantação.

Colocou-se o filtrado num balão periforme de 10mL, que foi anteriormente pesado. Por fim, colocou-se o filtrado no rotavapor a uma temperatura de 40°C para evaporar o clorofórmio (Figura 3.6) e pesou – se, posteriormente, o balão periforme.



Figura 3.6. Evaporação do clorofórmio no rotavaporador

Tratamento dos resultados

A percentagem de gordura total foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\frac{(M_f - M_i)}{P_a} \times 100$$

Sendo:

M_i - massa em gramas, da toma para análise

M_f - massa em gramas, da toma final

P_a - peso em gramas, da toma

3.1.4.4. Teor de cinzas

Fundamento do método:

O teor de cinza foi determinado de acordo com a norma NP 2032/1988. O teor de cinza de um alimento é o nome dado ao resíduo inorgânico que permanece após a carbonização da matéria orgânica, entre 525 e 550°C, e a evaporação da água e substâncias voláteis, a qual é transformada em CO_2 , H_2O e NO_2 . Assim sendo, a cinza de um alimento é o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Estes minerais são analisados tanto para fins nutricionais como também para segurança alimentar.

Equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Caixas de petri
- Máquina de picar (Pikatti 700w)
- Estufa de secagem a 105°C (Memmert)
- Exsicador
- Mufla a 525°C-550°C (Nabertherm B130 Controller)

Procedimentos

Pesou-se cerca de 5g de amêijoia para cadinhos de porcelana e levou-se a secar na estufa a 105±2°C durante a noite. Colocou-se no exsicador, deixou-se arrefecer e voltou-se a pesar. De seguida, colocou-se os cadinhos numa mufla a 550°C durante dezasseis horas (Figura 3.7) e deixou-se arrefecer no exsicador os cadinhos e, por fim, pesou-se.



Figura 3.7. Inceneração da toma em mufla

Tratamento dos resultados

O teor de cinza, expresso em gramas por 100g de amostra, calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

m_1 - a massa da cápsula , em grama

m_2 - a massa da cápsula coma toma, em grama

m_3 - a massa da cápsula com a cinza, em grama

3.1.4.5. Determinação dos minerais

Através dos ensaios preliminares foram otimizadas as soluções padrão para as seguintes determinações.

3.1.4.5.1. Determinação de potássio, sódio, chumbo e cádmio

Fundamento do método:

A determinação do potássio, sódio, chumbo e cádmio realizou-se através da espectrofotometria de absorção atômica com chama.

A preparação da amostra consistiu nas seguintes etapas: secagem, inceneração, branqueamento, filtração e diluição.

A espectrofotometria de absorção atômica por chama baseia-se na medição da absorção da intensidade da radiação emitida por uma pequena fração de átomos no estado excitado, sendo os mesmos excitados por uma chama, normalmente uma mistura de ar /acetileno (Boss & Fredeen, 1989; Csuros & Csuros, 2000)

Reagentes:

- Solução padrão de potássio 1000 ppm (Merck)
- Solução padrão de sódio 1000 ppm (Merck)
- Solução padrão de chumbo 1000 ppm(Merck)
- Solução padrão de cádmio 1000 ppm (Scharlau)
- Ácido nítrico a 65% (Panreac)
- Solução de ácido nítrico a 15% (Panreac)
- Solução de ácido nítrico a 5% (Panreac)

Equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Balões volumétricos
- Cadinhos de porcelana
- Máquina de picar (Pikatti 700 w)
- Estufa de secagem a 105°C (Memmert)

- Exsicador
- Placa eléctrica (Selecta Agimatic-E)
- Espectrofotómetro de absorção atómica de chama (Thermo Electron Corporation)

Procedimentos:

Pesou-se 5g de amostra num cadinho e efetuou-se a secagem das amostras em estufa a $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante uma noite. Procedeu-se a incineração da amostra na mufla, elevando a temperatura lentamente até aos 550°C durante 16 horas.

Posteriormente realizou-se o branqueamento das cinzas, com o auxílio do ácido nítrico a 65%, evaporou-se o ácido, levou-se a estufa à 400°C durante 30 minutos.

Para se dissolver as cinzas adicionou-se ácido nítrico a 15% com o auxílio de uma vareta, transferiu-se e filtrou-se para o balão de 25ml.

Para a quantificação dos metais pesados, chumbo e cádmio, utilizou-se as seguintes soluções padrão: 0,3ppm; 0,5ppm; 0,8ppm; 1ppm e 1,5ppm.

Para a quantificação do potássio utilizou-se as seguintes soluções padrão: 2 ppm; 4 ppm; 6ppm; 8ppm e 10ppm.

Para a quantificação do sódio utilizou-se as seguintes soluções padrão: 1ppm; 2ppm; 3 ppm; 4ppm e 6ppm.

Efetuiu-se uma diluição da amostra de 1:100 para determinação do potássio e sódio devido a estes estarem presentes na amostra com concentrações mais elevadas do que as dos metais pesados.

Aspirou – se cada uma das soluções padrão de trabalho e amostra preparada e efetuou – se a leitura, no espectrofotómetro de absorção atómica, nos diferentes comprimentos de onda (cadmio-295nm; chumbo 282,3nm; sódio - 589,0nm; potássio - 564nm) (Figura 3.8).



Figura 3.8. Espectrofotometria de absorção atômica por chama

3.1.4.5.2. Determinação de fósforo

Fundamento do método:

A determinação do fósforo baseia-se no método espectrofotométrico de acordo com a norma NP 4495/ 2010. A preparação da amostra consiste nas seguintes etapas: secagem, incineração, hidrólise ácida das cinzas com ácido nítrico, filtração, diluição, formação de um composto amarelo após adição de uma mistura de monovanadato de amónio e heptamolibdato de amónio e, por último, a medição através de um espectrofotómetro que mede a transmitância de um feixe de luz num determinado comprimento de onda após atravessar a solução numa célula de quartzo ou vidro. Este método determina a relação da transmitância e a concentração da solução, por intermédio de uma série de diluições obtidas a partir de uma solução padrão.

Reagentes:

- Solução de Ácido nítrico (65%) 1+ 2 (v/v) (Panreac)
- Solução de monovanadato de amónia 2,5 g/l (Fluka)
- Solução de heptamolibdato de amónio 50g/l (Scharlau)
- Solução de dihidrogenofosfato de potássio 479,4mg KH_2PO_4 /500ml de água destilada (Padrão concentrado) (Panreac)

Equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Balões volumétricos
- Cadinhos de porcelana
- Máquina de picar (Pikatti 700 w)
- Estufa de secagem a 105°C (Mettler)
- Exsicador
- Placa eléctrica (Selecta Agimatic-E)
- Papel de filtro
- Espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation - Heλ in α)
- Células de quartzo

Procedimentos:

Pesou-se 5g de amostra num cadinho e efetuou – se a secagem das amostras em estufa a $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante uma noite. Procedeu-se à incineração da amostra na mufla, elevando a temperatura lentamente até aos 550°C durante 16 horas.

Adicionou-se por pipeta 10ml de solução ácido nítrico aos cadinhos para dissolver a cinza e colocou-se a aquecer numa placa eléctrica, tapando com vidro de relógio. Deixou-se ferver durante 7-8 minutos. De seguida, transferiu-se com um funil para um balão volumétrico de 100ml. Do filtrado obtido, pipetou – se 10ml para um balão volumétrico de 50 ml. As soluções padrão, a solução da amostra a analisar e o ensaio em branco executaram-se de acordo com indicado na tabela seguinte (3.1)

Tabela 3.1. Soluções padrões para a realização da curva de calibração.

	10 µg/ml	20µg/ml	30µg/ml	40µg/ml	50µg/ml	Branco	Amostra
Padrão concentrado (ml)	1	2	3	4	5	-	-
S. Ácido Nítrico (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Reagentes coloração (ml)	15	15	15	15	15	15	15
Amostra (ml)	-	-	-	-	-	-	10

Para a quantificação do fósforo utilizou-se as seguintes soluções padrão

3.2. Avaliação da qualidade das amêijoas durante a refrigeração

3.2.1. Preparação da amostra

Avaliação da qualidade das amêijoas durante a refrigeração. Estas foram armazenadas na câmara de refrigeração a uma temperatura $\pm 5^{\circ}\text{C}$, e foram medidas pelo termopar (Hanna Instruments HI 98804) durante 10 dias, em que foram recolhidas amostras nos dia 0 (controlo), 2, 3, 6, 8 e 10.

As amêijoas foram abertas e foi retirada a parte edível de forma conveniente, a qual foi homogeneizada na máquina picadora (Pikatti 700W).

Os extratos do ABVT e TBA foram colocados na câmara de congelação a -20°C até à determinação analítica.

3.2.1.2. Determinação do pH

Fundamento do método:

Utiliza-se o pH para medir a acidez ou a alcalinidade do meio aquoso. Este baseia-se na calibração direta do medidor com soluções padrão cuidadosamente prescritas, seguido de uma determinação potenciométrica do pH das soluções desconhecidas (Skoog *et al.*, 2007).

Equipamentos:

- Eléctrodo de pH (Symphony pH Meter SP70P)

Procedimentos

O valor de pH é determinado por potenciometria. Homogeneizou-se 2g de músculo em 20ml de água destilada (1:10 m/v). A sua medição foi efetuada através do eléctrodo de pH (figura 3.9), à temperatura de 21°C.



Figura 3.9. Medição do pH por potenciometria.

3.2.1.3. Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT)

Fundamento do método:

O teor de azoto básico volátil total é determinado de acordo com a norma NP 2930/1988 e consiste na extração das bases voláteis, através de uma solução de ácido tricloroacético, alcalinização por ação de carbonato de potássio para libertação das bases voláteis e a sua recepção numa solução de ácido bórico seguido de titulação.

Reagentes:

- Solução de ácido tricloroacético a 5% (m/V) (Scharlau)
- Álcool etílico a 95% (Panreac)
- Solução de ácido clorídrico 0,02N (Fisher Scientific)
- Solução de sulfato de amónio a 0,1% (m/V) (Merck)
- Solução de verde bromocresol (Merck)

- Solução de vermelho de metilo (Merck)
- Solução de ácido bórico a 4% (Panreac)
- Solução saturada de carbonato de potássio (Fisher Scientific)
- Vaselina

Equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Células de Conway
- Estufa de secagem a 35-40 °C (Mettler)
- Máquina de picar (Pikatti 700 w)
- Microbureta graduada (0,01 cm³)
- Papel de filtro
- Erlenmeyer

Procedimentos:

Pesou-se 25g de amostra e extraiu-se as bases voláteis com a solução de ácido tricloroacético durante 2 minutos. Filtrou-se o extrato com papel de filtro e colocou-se na câmara de congelação a – 20°C a aguardar para a análise. Descongelou-se quando esta se realizou.

Adicionou -se 1mL de ácido bórico com auxílio da pipeta na célula de Conway. Transferiu-se para a coroa circular 1 mL do filtrado, 0,5mL de água destilada e 1mL da solução de carbonato de potássio. As células foram cobertas com uma com tampa e colocou-se na estufa, durante 90 minutos e a 40°C para que ocorresse a libertação das bases voláteis, que são recolhidas na solução de ácido bórico. Seguidamente, titulou-se com a solução de clorídrico até atingir uma coloração rosa (Figura 3.10).

Efetou-se em paralelo o controlo de difusão (substituiu-se o volume da toma para análise por igual volume de sulfato de amónio) e o ensaio em branco (substituiu-se o volume da toma para análise por igual volume de água).



Figura 3.10. Titulação com solução de ácido clorídrico até obtenção da coloração rosa.

Tratamento de resultados

Os resultados foram expressos em mg/100g da parte edível da amêijoia, de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{21 \times (V_2 - V_0)}{(V_1 - V_0) \times V_3 \times m} \times (100 + H)$$

Sendo:

V_0 – Volume da solução de ácido clorídrico gasto no ensaio em branco, em centímetros cúbicos;

V_1 – Volume da solução de ácido clorídrico gasto no ensaio de controlo de difusão, em centímetros cúbicos;

V_2 - Volume da solução de ácido clorídrico gasto no ensaio com a toma, em centímetros cúbicos;

V_3 – Volume da solução da amostra utilizada na determinação, em centímetros cúbicos

H – humidade da toma para análise;

m- massa da toma para análise, em gramas.

3.2.1.4. Determinação do teor de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Fundamento do método:

O índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) é determinado de acordo com a norma NP 3356/1990 e consiste na extração do aldeído malónico com uma mistura de ácido tricloroacético, galato de propilo e EDTA. A reação do aldeído malónico com o ácido tiobarbitúrico forma um complexo corado vermelho que é medido através da espectrofotometria UV-Vísivel.

Reagentes:

- Solução de ácido tricloroacético a 7,5 % (m/v)
- Ácido tricloroacético (Scharlau)
- 0,1% Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck)
- 0,1% de solução alcoólica de galato de propilo a 5% (m/v)
- Galato de propilo 98% (AcrösOrganics)
- Solução de ácido tiobarbitúrico $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ (TBA) (Fluka)
- Solução padrão de TEP a $10^{-8} \text{ mol mL}^{-1}$
- Ácido tricloroacético a 7,5% (Scharlau)
- Tetraetoxipropano $10^{-5} \text{ mol mL}^{-1}$ (TEP) (Sigma-aldrich)
- Galato de propilo 98% (AcrösOrganics)

Equipamentos:

- Balança (Sartorius de precisão 0.01g)
- Máquina de picar (Pikatti 700w)
- Espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation - Helina)
- Estufa de secagem a 105°C (Memmert)
- Tubos de ensaio com rolha
- Erlenmeyer
- Pipeta

Procedimentos:

Pesou-se 15g de amostra e extraiu-se o aldeído malónico com adição da solução de ácido tricloroacético a 7,5% (m/v), contendo 0,1% de EDTA e 0,1% de galato de propilo durante 2 minutos. Filtrou-se o extrato com papel de filtro e colocou-se na câmara a -20°C a aguardar pela análise, descongelando-se quando se realizou a análise. As soluções padrão, a solução da amostra analisadas e o ensaio em branco foram executadas de acordo com indicado na tabela seguinte (3.2).

Tabela 2.2. Soluções padrões para determinação do índice TBA

Concentração em aldeído malónico	0.005 μmoles	0.01 μmoles	0.015 μmoles	0.02 μmoles	0.025 μmoles	Branco	Amostra
Solução (TCA) a 7,5% (m/v) (ml) ¹	7	6.5	6	5.5	5	7.5	5
Solução reagente TBA (ml) ²	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Solução ^{padrão} TEP (ml) ³	0.5	1	1.5	2	2.5	-	-
Amostra (ml)	-	-	-	-	-	-	2.5

1. Solução de ácido tricloroacético a 7,5% (m/v), 0,1% EDTA e 0,1% galato de propilo
2. Solução de reagente TBA a 0.02 mol dm^{-3}
3. Solução - Padrão de TEP a $10^{-8}\text{ mol.mL}^{-1}$

Colocou-se as soluções padrão, o ensaio em branco e a amostra em banho de água a ferver durante 40 minutos até atingir uma coloração rosada. Retirou-se do banho, arrefeceu-se em água fria e agitou-se ligeiramente. De seguida, transferiu-se o conteúdo de cada tubo para células quartzo e mediu-se no espectrofotómetro ao comprimento de onda de 530nm.

Tratamento de resultados

Os resultados foram expressos em mg/1000g de parte edível da amêijoia e foram obtidos de acordo com a equação seguinte:

$$\frac{72 \times c}{m \times V} \times (30 + mH)$$

Sendo:

c – concentração do aldeído malónico, expressa em micromoles.

V _ Volume, em mililitros, da toma.

H – humidade da amostra, em percentagem.

3.2.2. Avaliação microbiológica**3.2.2.1. Preparação da amostra**

Para a avaliação microbiológica das amêijoas durante a refrigeração, estas foram armazenadas na câmara de refrigeração a uma temperatura $\pm 5^{\circ}\text{C}$, que foi medida pelo termopar (Hanna Instruments HI 98804), durante 10 dias, em que foram recolhidas amostras no dia 0 (controlo), 2, 3, 6, 8 e 10.

As amêijoas foram abertas de forma a ser retirada a parte edível destas, juntamente com o líquido intravalvar, sendo esta tarefa auxiliada por pinças e bisturis estéreis. Em seguida, as amostras foram colocadas em sacos de Stomacher estéreis juntamente com o agente diluidor respectivo para cada pesquisa.

3.2.2.2. Preparação dos diluentes e dos meios de cultura

A preparação dos diluentes e dos meios de cultura foi feita conforme as instruções dos seus respectivos fabricantes. Os meios de cultura e os diluentes foram sujeitos a esterilização através da autoclave (Raypa) a 121°C , durante 15 minutos e armazenados numa câmara de refrigeração. Os meios de cultura que não podiam ser sujeitos a esterilização foram seguidamente plaqueados em placa de petris.

3.2.2.3. Pesquisa de *Salmonella spp.***Fundamento do método:**

A pesquisa de *Salmonella spp.* baseia-se na norma ISO-6579, que tem como etapas (i) o pré-enriquecimento; (ii) o enriquecimento seletivo; (iii) o plaqueamento em meio seletivo-indicador; e (iv) a confirmação (provas bioquímicas e serotípicas).

Reagentes:

- Água peptonada tamponada (Himedia)
- Caldo de Enriquecimento Selenito-Cistina (Merck)
- Caldo de Enriquecimento de Salmonella (Rappaport) - (Merck)
- Agar Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (Merck)
- Agar verde Brilhante modificado (BPLS) (Merck)
- Agar Kligler (Kligler Iron Agar) (Merck)
- Agar Nutriente (Merck)

Equipamentos:

- Balança (Philips HR2391/00).
- Autoclave (Raypa)
- Bico Bunsen
- Faca, pinças e espátula esterilizadas
- Erlenmeyer
- Copos de plástico ou vidro
- Provetas
- Pipetas estéreis descartáveis
- Saco esterilizado para Stomacher
- Tubos de ensaio
- Homogeneizador (Stomacher) (Interscience Bagmixer)
- Placas de petri estéreis descartáveis
- Ansa estéreis descartáveis
- Estufa com agitação rotativa a 37 °C (Stuart orbital incubator SI 50)
- Banho - maria a 42 °C (Julabo SW 22)
- Estufa a 37 °C (Binder)

Procedimentos

No pré-enriquecimento (não seletivo) pesou-se 25g de amostra em 225ml de água peptonada tamponada e incubou-se durante 24 horas a 37 ° C numa estufa com agitação, seguindo - se a etapa do enriquecimento seletivo em que se transferiu 1mL do pré enriquecimento para um tubo com 9ml do meio seletivo Rapport e a mesma quantidade para um tubo com 9mL do meio seletivo Selenito – Cistina, levando –se a depois incubar 18 a 24 horas no banho -maria a 42°C.

Posteriormente procedeu-se a etapa do plaqueamento em meio seletivo: com o auxílio de uma ansa, retiram-se 10µl de cada tubo do enriquecimento seletivo para duas placas com o meio o seletivo agar BPLS e outras duas com XLD através do processo de esgotamento. Estas, foram a incubar a 37 °C, durante por 24 horas a 48 horas, após de identificar as colónias suspeitas de *Salmonella* (meio XLD - colónias da mesma cor do meio, transparentes com ou sem centro negro e meio BPLS - colónias vermelhas ou rosadas com halo vermelho) e foram purificadas em agar nutritivo.

Na etapa da confirmação as colonias foram inoculadas em meio Kligler. Aquelas em que *Salmonella* esteja presentes tiveram as seguintes definições: cunha rosada (lactose -), fundo amarelo (glucose +), fundo negro (H₂S⁺), produção de gás e crescimento ao longo da sementeira.

Os resultados foram expressos em presença/ausência em 25g de amostra.

3.2.2.4. Pesquisa de bactérias Coliformes e pesquisa provável de *E.coli*

Fundamento do método:

A pesquisa de bactérias Coliformes e pesquisa provável de *E.coli* baseou-se na técnica do Número Mais Provável (NMP). O método do NMP permite calcular o número de um microorganismo específico, utilizando tabelas de probabilidade. As diluições decimais da amostra são inoculadas em séries de tubos contendo meio líquido seletivo. Os tubos são positivos quando têm crescimento e/ou produção de gás de fermentação.

Reagentes:

- Caldo verde brilhante lactose bile a 2% (VB) (Brilliant Green Bile Broth 2%, Merck)
- Agar cristal violeta -vermelho bile (VRB) (Violet Red Bile Agar, Merck)
- Água peptonada tamponada (Himedia)

Equipamentos:

- Balança (Philips HR2391/00).
- Autoclave (Raypa)
- Bico Bunsen
- Faca, pinças e espátula esterilizadas
- Erlenmeyer
- Copos de plástico ou vidro
- Provetas
- Pipetas estéreis descartáveis
- Saco esterilizado para Stomacher
- Tubos de ensaio
- Tubos de fermentação (Durham)
- Homogeneizador (Stomacher) (Interscience Bagmixer)
- Placas de petri estéreis descartáveis
- Ansas estéreis descartáveis
- Estufa a 30 °C (Binder)
- Estufa a 44 °C (Binder)

Procedimentos:

Pesquisa de coliformes

Pesou-se 25g da amostra e adicionou-se 225ml de solução de água tamponada a esta, a qual é, de seguida homogeneizada (suspensão – mãe). Removeu-se aseticamente 1ml da referida suspensão para tubo de ensaio que contém 9ml do agente diluidor. Depois, retirou -se, com uma nova pipeta, 1ml desta diluição e transferiu-se para um novo tubo de ensaio. Procedeu-se do mesmo modo até obter a diluição 10^{-3} . Realizou-se, posteriormente, a inoculação em meio VRBA, de cada uma das diluições pelo método de espalhamento, em placas que foram incubadas numa estufa a 30°C. Considerou-se colónias coliformes, todas as colónias onde as bactérias que se desenvolveram em 24 horas, apresentaram cor vermelho-púrpura e possuíam cerca de 1 a 2mm de diâmetro.

Pesquisa provável de *E.Coli* de origem fecal

Repicou-se 4 colónias características do meio VRBA para o caldo verde brilhante lactose bile a 2% com recurso a uma ansa esterilizada. Após a homogeneização dos tubos, estes foram incubados numa estufa a 44°C durante 24 horas. Os tubos de caldo verde brilhante lactose bile a 2% positivos foram aqueles que apresentaram turvação e gás no tubo de Durham. Através destes, verificou-se na tabela do NMP, o resultado em NMP de coliformes por 10g de amostra.

3.2.2.5. Pesquisa *Vibrio sp.*

Fundamento do método:

Este método baseia-se na ISO 8914 (1990) e tem como etapas (i) a preparação da suspensão – mãe; (ii) inoculação do meio seletivo, TCBS; (iii) confirmação por exame microscópico e análises bioquímicas (testes da oxidase e Gram).

Reagentes:

- Agar TCBS (Merck)
- Agar nutritivo salino (Merck)
- Blood Agar base nº2 (Merck)
- Alkaline saline peptonewater
- Peptona carne (Merck)
- Cloreto de sódio
- Material necessário ao teste de Gram
 - Teste da oxidase

Equipamentos:

- Balança (Philips HR2391/00).
- Autoclave (Raypa)
- Bico Bunsen
- Faca, pinças e espátula esterilizadas
- Erlenmeyer
- Copos de plástico ou vidro
- Agitador

- Provetas
- Pipetas estéreis descartáveis
- Saco esterilizado para Stomacher
- Tubos de ensaio
- Tubos de fermentação (Durham)
- Homogeneizador (Stomacher) (Interscience Bagmixer)
- Placas de petri estéreis descartáveis
- Ansas estéreis descartáveis
- Estufa a 37°C (Binder)
- Estufa a 35 °C (Binder)

Procedimentos:

Para a preparação da suspensão – mãe pesou-se 25g de amostra em 225ml de *água salina peptonada alcalina* e agitou-se. Em seguida, mediu-se 1ml e transferiu –se para um tubo com 9 ml de água salina peptonada alcalina. Após executar as diluições por ordem decrescente e de forma sucessiva, estas foram a incubar, tanto a suspensão - mãe como os tubos a 35°C ou 37°C durante 8 horas.

Repicou-se cada diluição em agar TCBS e incubou – se novamente as placas a 35 ou 37°C durante 18 horas. De seguida, procurou-se a presença de colónias características de *V. parahaemolyticus* que possuem 2 a 3mm diâmetro, são macias e apresentam a cor verde (sacarose negativa). Se o desenvolvimento for lento, a coloração fraca ou não existirem colónias características, a incubação deve continuar até 24 horas. No fim da incubação, selecionou-se 5 colónias características de cada diluição (se existir um nº inferior deve-se utilizar as que se desenvolveram) e purificou-se em agar nutritivo salino, incubando 35 a 37°C de 18 a 24 horas. Posteriormente executou -se rampas de agar nutritivo salino e voltou-se a incubar a 35 ou 37°C de 18 a 24 horas.

Confirmação:

Nesta etapa executaram – se os testes da oxidase, Gram e exame microscópico da forma e motilidade do Vibrio em água salina peptonada alcalina (incubada a 35°C ou 37°C de 1 a 6h). Para a diferenciação do Vibrio de outros Gram inoculou –se em Blood Agar base nº2 plaqueado em placas de petri e no fim colocaram-se discos O129, levando a incubar a 35°C durante 24h.

3.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através dos programas EXCEL e Statistica 2.1. O método utilizado foi a análise da variância com um factor de variação “One way ANOVA”, utilizando o teste das comparações múltiplas -Teste Turkey para estudo biométrico. Para o estudo do valor nutricional, uma vez que estes não seguiam a distribuição normal, utilizou-se os testes não paramétricos, nomeadamente o teste Kruskal-Wallis Test.

4. Resultados e Discussão

4.1. Dados biométricos

Através da tabela 4.1 é apresentado a variação sazonal dos dados biométricos da amêijoia-boia nas três estações do ano (inverno, primavera, verão) em que estas foram capturadas. A variação sazonal desses parâmetros em geral apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). Em relação aos parâmetros do peso da amêijoia e do seu miolo, estes no verão não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação às outras duas estações. Por outro lado, o parâmetro do comprimento da amêijoia não se diferenciou significativamente entre as estações de inverno e da primavera. No verão, as amêijoas apresentaram comprimentos mais elevados (3,31cm), sendo que o peso da amêijoia é mais elevado no inverno e no verão, cerca de 7,0g.

Tabela 4.1 Variação sazonal dos dados biométricos da amêijoia-boia

	Inverno	Primavera	Verão
	n=50	n=50	n=50
Comprimento (cm)	2,8±0,28 ^b	2,9±0,26 ^b	3,1±0,32 ^a
Peso (g)	7,0±1,75 ^a	6,0±1,04 ^b	6,6±1,48 ^{ab}
Peso miolo (g)	1,7±0,61 ^a	1,2±0,44 ^b	1,7±0,73 ^{ab}

Letras diferentes são para valores significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.

De acordo com Henriques (1998), no inverno existe uma diminuição na temperatura da água podendo o crescimento das amêijoas ser bastante reduzido. Por esta razão, justifica-se o fato das amêijoas apresentarem no inverno um comprimento menor que no verão. Também segundo este autor, na primavera e no outono o desenvolvimento é mais elevado pois as amêijoas que ainda não atingiram a maturidade sexual crescem rapidamente no final de março e de novembro. As que já atingiram a maturidade, durante o verão, apresentam uma diminuição no crescimento.

Os fatores ambientais tais como a temperatura e a disponibilidade de alimento pode interferir no crescimento dos bivalves (Sastry, 1979; Maitre-Allain, 1982; Beninger & Lucas, 1984; Body *et al.*, 1986; Laing *et al.*, 1987). Segundo Urritia *et al.* (1999), quando o alimento é abundante, a energia excedente é utilizado pelos animais para o crescimento

de tecidos somáticos e também para o desenvolvimento das gónadas. No estudo realizado por Urrutia *et al.* (1999), o crescimento da *Ruditapes decussatus* aumentou rapidamente a partir de março a julho, como consequência das condições nutricionais ideais e aumento da temperatura da água ou seja o crescimento somático (primavera) e desenvolvimento gonadal (início do verão), portanto ocorreram durante este período. O crescimento negativo foi restrito ao inverno e verão e foi associada com condições nutricionais pobres (inverno) e altas taxas de gasto metabólico induzido por altas temperaturas (final do verão).

Este presente trabalho, pode-se verificar que este caso não ocorreu, uma vez que não houve diferenças significativas no peso total e no peso do miolo, entre o inverno e o verão. Só ocorre diferenças significativas na primavera, podendo-se indicar que nesta estação houve pouca disponibilidade de alimento.

4.2. Composição nutricional

Na tabela 4.2 é demonstrado a variação sazonal na composição nutricional da amêijoaboia, nas três estações do ano (inverno, primavera e verão) em que foram capturadas. Verificou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na composição nutricional nas diferentes estações do ano. Este fato pode-se explicar pelo número de amostragem ter sido muito baixo para uma rigorosa avaliação estatística. Contudo, no teor de humidade houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o inverno e a primavera.

Tabela 4.2. Variação sazonal da composição nutricional da amêijoa-boia

	Inverno 1ºAmostragem n=3	Primavera 2ºAmostragem n=3	Verão 3ºAmostragem n=3
Humidade (%)	89,6±0,51 ^a	80,0±0,12 ^b	80,8±0,18 ^b
Proteína (%)	9,8±0,19 ^a	14,7±1,57 ^a	13,1±0,52 ^a
Gordura (%)	0,2±0,12 ^a	0,2±0,12 ^a	0,2±0,23 ^a
Cinza (%)	1,7±0,04 ^a	2,5±0,16 ^a	1,8±0,18 ^a
Minerais			
Sódio (mg/100g)	29,1±0,73 ^a	121,4±18,00 ^a	230,1±39,43 ^a
Potássio (mg/100g)	94,9±3,73 ^a	132,1±33,23 ^a	147,7±11,96 ^a
Fósforo (mg/100g)	89,8±9,87 ^a	219,7±15,23 ^a	258,1±7,70 ^a
Metais pesados			
Chumbo (ppm)	LD	LD	LD
Cádmio (ppm)	0,001	0,001	0,001

LD: abaixo do limite de detecção

Letras diferentes são para valores significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%

4.2.1 Humidade

Na amêijoa, a água corresponde cerca de 81,1% da sua constituição (tabela 1.2) segundo o INSA (2006). Segundo Ogawa & Maia (1999), a percentagem de humidade varia conforme diversos fatores, nomeadamente a espécie, a época do ano, a idade e o sexo.

Verificou-se na tabela 4.2 que o inverno apresentou uma diferença significativa ($p < 0.05$), tendo um valor superior (89,6%) em relação às estações restantes, primavera (80,0%) e verão (80,8%).

No estudo realizado, a amêijoa-boia da Ria Formosa por Aníbal *et al.* (2011), os valores obtidos durante o outono e inverno (86,9% em novembro e 85,9% em março e) foram superiores aos valores obtidos no verão (82,6% em junho).

Estes valores obtidos no estudo de Aníbal *et al.* (2011) foram relativamente aproximados aos valores obtidos neste presente trabalho, sendo que o inverno mostrou valores superiores aos valores do verão. Os valores de outono não foram possíveis avaliar uma vez que não foi realizada a sua determinação.

Ogawa & Maia (1999), também descreveram que existe uma relação inversa bem caracterizada entre os teores de humidade e os lípidos, assim como entre a água e a proteína com menor intensidade. Pode-se assim explicar a diferença entre o inverno em relação às outras estações, uma vez que na tabela 4.2 pode-se confirmar que quando existe um aumento o teor de humidade, diminuem os teores de proteína o que está de acordo com o estudo de Ogawa & Maia (1999).

4.2.2 Proteína

A variação sazonal da composição bioquímica da amêijoia – boa está relacionada com o ciclo reprodutivo e o armazenamento de energia, segundo o descrito por vários autores Pérez Camacho *et al.*, 2003; Ojea *et al.*, 2004). Segundo Delgado *et al.* (2004), as reservas de energia são de uma importância considerável na reprodução e no armazenamento de energia sazonal. Os alimentos e a temperatura são os principais fatores que regulam o tempo e a taxa de armazenamento de energia nos bivalves. A *Ruditapes decussatus* acumula glicogénio, antes da gametogénese, no outono e no início do inverno. O glicogénio é usado como fonte de energia para o desenvolvimento das gónadas, e no período da desova que ocorre no verão (Ojea *et al.*, 2004).

Segundo Hollanda (1978), a proteína é um importante componente orgânico de oócitos de bivalves. Também relatado por Beninger & Lucas (1984), serve como reserva de energia para bivalves adultos, particularmente durante a gametogénese. No trabalho realizado por Serdar & Lok (2009) realizada na Turquia, o teor de proteínas variou entre 25%-55% das *Ruditapes decussatus*. O teor de proteína começou a aumentar partir de janeiro e atingiu um pico em março e, em seguida diminuiu acentuadamente em abril, antes da desova. O teor de proteínas foi aproximadamente quase constante até julho e janeiro. Estes resultados foram explicados pelos autores que sugeriram que a proteína armazenada no inverno pode ser explicada pela maturação das gametas. Quando as amêijoas se encontravam em fase ativa entre janeiro e março, os valores de proteína

atingiam o máximo. A proteína pode ser uma fonte de energia alternativa sob as condições sob a falta de alimento (Beninger & Lucas, 1984; Galap *et al.*, 1997).

Neste estudo não se verificou este facto do ciclo reprodutivo influenciar o teor de proteínas, uma vez que não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) no teor das proteínas nas diferentes estações do ano estudadas, como se pode verificar na tabela 4.2.

Os valores de proteína obtidos foram entre 9,8% a 14,7%, próximos do valor de referência indicado na tabela de composição de alimentos portugueses do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo (2006).

4.2.3 Gordura

A composição de ácidos gordos nos bivalves varia de acordo com a espécie, mas, nessas mesmas espécies, existem variações devido a factores internos, tais como o ciclo gametogénico e, factores externos tais como a temperatura, a salinidade e de certos alimentos, que têm uma grande influência sobre o metabolismo dos lípidos e da composição biológica das membranas (Joseph, 1982; Bell *et al.*, 1986; Sargent *et al.*, 1990).

No estudo de diversos autores nomeadamente Giese, 1969; Gabbott, 1976; Sastry, 1979; Bayne & Newell, 1983; Barber & Blake, 1985, a variação sazonal dos lípidos está relacionada com o ciclo produtivo, uma vez que a energia é armazenada na gametogénese, quando o alimento é abundante, sob a forma de glicogénio, lípidos e proteínas. Sendo assim, os fatores ambientais desempenham, aparentemente, um papel dominante na determinação de eventos nos ciclos de armazenamento. Os valores do teor de gordura não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) não havendo uma variação sazonal esperada segundo estes autores.

Os teores de gordura encontrados nas amêijoas foram aproximadamente de 0,2%, valores mais baixos comparados com os valores referidos na tabela do INSA (2006) que foram de 0,9%. Segundo Ackaman (1995) os teores baixos de gordura são devido a os bivalves armazenam o seu excedente de energia como reserva de glicogénio e não como depósito de gordura, enquanto os crustáceos e cefalópodes têm glândulas digestivas, onde a gordura pode ser armazenada temporariamente.

4.2.5 Minerais

4.2.5.1.Cinza

A composição bioquímica sazonal reflete as fases reprodutivas da *R. decussatus* (Gözler & Tarkan 2000, Mohite *et al.*, 2009). De janeiro até junho, o aumento das temperaturas induzem a gametogénese (Delgado & Pérez-Camacho 2007), resultando num aumento percentual da comestibilidade e do índice de condição. Durante este período, *R. decussatus* acumula e utiliza os hidratos de carbono, lípidos, proteínas e sais minerais, presumivelmente, para o desenvolvimento das gónadas. A queda repentina em todos estes parâmetros ocorre entre junho e julho, provavelmente, por coincidir com a fase de desova e pode durar até setembro, quando as espécies entram na fase de repouso (Meneghetti *et al.*, 2004)

No trabalho realizado Aníbal *et al.* (2011), as cinzas da *Ruditapes decussatus* encontradas na Ria Formosa (sul de Portugal), foi significativamente maior ($p < 0,05$) durante os meses de janeiro e de fevereiro (3,4 e 3,6%) quando comparado com o resto do ano. Entre março e agosto, observou-se valores intermediários (cerca de 3,1%). De agosto a novembro, as amêijoas apresentaram os menores valores de teor de cinzas (cerca de 2,8%).

Neste estudo presente, o teor de cinza não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação às diferentes estações do ano (tabela 4.2.) o que está de acordo com os estudos de Gözler & Tarkan (2000) e Mohite *et al.* (2009). Os valores foram entre 1,7%-2,5%, ligeiramente inferiores aos mencionados no estudo anterior que foram de 2,8%-3,6%.

4.2.5.1 Sódio

A variação dos teores de sódio nas amêijoas reportados por Lall (1994) foram entre os valores de 180-200mg/100 mg.

Os teores encontrados neste presente trabalho foram um pouco inferiores aos valores de referência (244mg/100g), tendo o inverno apresentado um valor muito baixo (29,1mg/100g), o que poderá ter ocorrido algum erro de leitura do espectrofotómetro de absorção atómica de chama.

Em relação à ingestão diária recomendada de sódio que é de 500mg, segundo Almeida & Afonso (2001), os valores encontrados na amêijoia boa foram inferiores.

4.2.5.2 Potássio

Os teores de potássio obtidos encontraram-se entre 94,9 e 147,7mg/100g. Lall (1994) mencionou quantidades de potássio que variaram entre 35-228 mg/100g, o que indica que os valores deste estudo estão dentro desta variação.

Não ocorreu diferenças significativas ($p>0,05$) no teor de potássio nas diferentes épocas do ano estudadas. Os valores de potássio encontrados na amêijoia boa foram inferiores aos valores da ingestão diária recomendada que é de 2000mg (Almeida & Afonso 2001).

4.2.5.3 Fósforo

Segundo Lall (1994) os valores de fósforo das amêijoas variam entre os 90-350 mg/100g. Verifica-se que os valores determinados neste trabalho (89,8mg/100g, 219,7mg/100g, 258,1mg/100g) encontram-se dentro desta gama de valores.

Contudo, o valor de referência de ingestão diária recomendada de fósforo é de 1200mg, descrito por Almeida & Afonso (2001), é superior aos valores encontrados nas diferentes estações.

4.2.6 Metais Pesados

4.2.6.1 Chumbo e cádmio

Segundo Figueira *et al.* (2011), os organismos marinhos estão sujeitos à contaminação química do ambiente marinho, como por exemplo, pelos metais. Os metais, especialmente os que não são necessários para a atividade metabólica (por exemplo, mercúrio, chumbo e cádmio), são tóxicos mesmo em concentrações baixas, não só para os organismos em que eles se acumulam, mas também para os seus consumidores. Os metais podem acumular-se nos tecidos de espécies de moluscos em concentrações muitas vezes maiores do que as concentrações na água e os sedimentos, e pode ser acumulada na cadeia alimentar para níveis que podem causar deficiência fisiológica em níveis tróficos superiores, ou seja, para os consumidores. Assim, os teores de metais que

são determinados em moluscos para consumo humano e que apresentam níveis de contaminação acima dos legais de acordo com o Regulamento nº 1881/2006 são de 1,5mg /kg para o Pb e 1,0mg /kg para Cd) são rejeitados.

López-Artiguez *et al.* (1989) observaram valores até 1,5mg/kg para o chumbo e até 4,1mg/kg para cádmio em moluscos bivalves contaminados no estuário do Huelva, em Espanha.

Smaoui-Damak *et al.* (2009) relatam no seu estudo, que no geral, as mudanças sazonais, com a variação do ciclo reprodutivo poderiam afetar as concentrações de metais bioacumulados. É demonstrado nesse estudo, que as concentrações de Cd na *Ruditapes decussatus* foram correlacionadas negativamente com o peso da glândula digestiva dos moluscos.

Os valores obtidos na quantificação do cádmio e no chumbo nas diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão) encontraram-se abaixo do valor máximo admissível, segundo o que consta no Regulamento nº 1881/2006. Não ocorreu nenhuma variação sazonal deste metal. Sendo assim, pode-se verificar que o consumo da amêijoas-boas presente neste estudo nas diferentes estações do ano é seguro no que diz respeito à concentração de metais, como o chumbo e cádmio.

4.3. Avaliação da qualidade das amêijoas durante a refrigeração

Segundo Ogawa & Maia (1999) e Pacquit *et al.*, 2005 a determinação da frescura do pescado e do marisco incluem: análises sensoriais (odor, sabor e textura); análises microbiológicas (contagem total de microrganismos); análise das propriedades físicas (pH, tensão das fibras musculares, viscosidade e textura) e análises químicas com determinação de ABVT e TBA e histamina. Na tabela seguinte, apresentam-se os resultados obtidos das várias amostragens efetuadas à amêijoas-boas durante dez dias de armazenamento em refrigeração a ± 5 °C.

Tabela 4.3. Avaliação da deterioração das amêijoas durante 10 dias de armazenamento em refrigeração (± 5 °C)

	pH	ABVT (mg/100g)	TBA (mg/1000g)
Dia 0	6,6 \pm 0,05	1,9 \pm 0,43	15,1 \pm 0,93
Dia 2	6,9 \pm 0,01	12,6 \pm 5,78	17,0 \pm 0,19
Dia 3	7,0 \pm 0,01	14,7 \pm 3,78	18,7 \pm 1,39
Dia 6	7,0 \pm 0,04	17,3 \pm 2,18	23,3 \pm 2,12
Dia 8	7,2 \pm 0,01	29,9 \pm 6,55	25,2 \pm 2,35
Dia 10	6,9 \pm 0,04	45,0 \pm 3,78	27,7 \pm 6,65

4.3.1 pH

O valor de pH inicial das amêijoas frescas foi de 6,6 (ver tabela 4.3.). Durante o armazenamento, o valor de pH variou ligeiramente, aumentando conforme o tempo, com exceção do décimo dia em que este diminui como se encontra apresentado na Figura 4.1.

Segundo Huss (1995), Howgate (2009) e Gonçalves (2010) o valor de pH aumenta gradualmente durante o período de conservação, devido à formação de compostos químicos, em particular compostos azotados, resultante das reações autolíticas e bacterianas. Tendo em consideração os resultados deste presente trabalho verifica-se que ao longo do período de conservação, ocorreram reações autolíticas e bacterianas.

A redução ocorrida no último dia, pode-se explicar, como descrito por Huss (1995) e Howgate (2009) que, após a morte do pescado, o transporte de oxigénio ao músculo é interrompido e inicia-se uma nova via de produção de energia. A glicólise anaeróbia resulta da acumulação de ácido láctico, o que que reduz o pH do músculo. Sendo assim, no décimo dia as amêijoas provavelmente começaram a morrer.

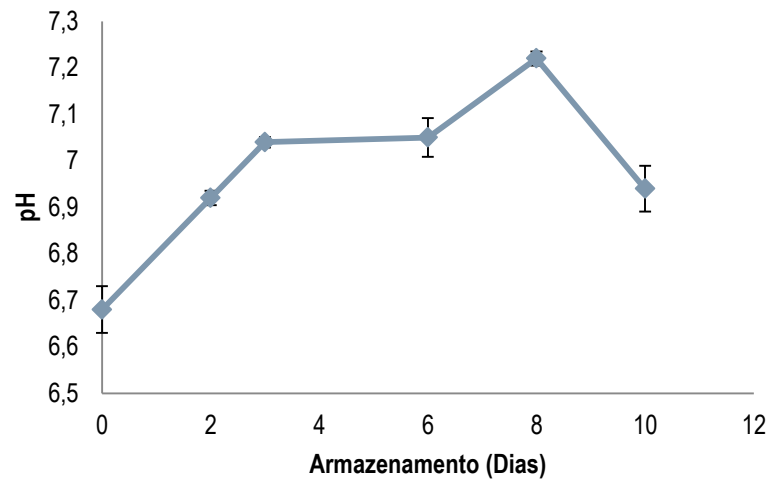


Figura 4.1. Valores de pH representante da deterioração da amêijoas-boa durante 10 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5^\circ\text{C}$)

4.3.2 Azoto básico volátil total (ABVT)

A deterioração ou as alterações autolíticas são responsáveis pela perda inicial da qualidade do pescado fresco, mas contribuem muito pouco para a deterioração do pescado em refrigeração. No entanto, no peixe congelado as alterações autolíticas são de grande importância. Um exemplo é a redução do óxido de trimetilamina (OTMA), que no pescado em refrigeração é um processo bacteriano que leva à formação de trimetilamina (TMA) (Huss, 1997).

Os valores do ABVT nas amêijoas armazenadas aumentaram ao longo dos dias, ocorrendo um aumento exponencial a partir do sexto dia (17,3 mg/100 g), atingindo no décimo dia um valor 45 mg/100g (figura 4.2). Pode-se explicar este acontecimento pela formação de compostos voláteis, que são resultantes das atividades autolíticas e bacteriana (Huss, 1995; Haard, 1992; Gram & Huss, 1996).

Segundo Ogawa (1999), os bivalves em excelente estado de frescura, o teor de ABVT atinge o valor entre 5 a 10 mg/ 100g de músculo; o pescado com uma frescura razoável pode atingir valores entre 15 a 25 mg/100g de músculo.

No início da degradação, o teor de ABVT pode atingir valores até 30 a 40 mg/100g e, quando este está bastante degradado, o ABVT poderá atingir valores de 50 mg/100g. Tendo em consideração o estudo descrito por Ogawa, os resultados obtidos nas

condições experimentais estudadas poderão indicar que as amêijoas a partir do oitavo dia possuem deterioração na sua qualidade.

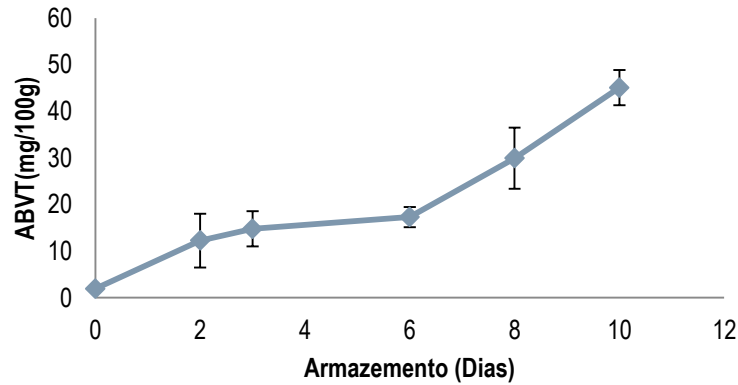


Figura 4.2. Valores de ABVT da amêijoas-boas durante 10 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)

4.3.3 Índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Segundo Freeman & Hearnberger (1993). A oxidação lipídica envolve a reação do oxigênio com radicais livres a partir de ácidos gordos insaturados, o que leva à produção de sabores estranhos e aromas. O método mais comum determinar a oxidação lipídica no pescado é a medição do ácido tiobarbitúrico (TBA).

A rancidez oxidativa é influenciada por diversos fatores: perfil de ácidos gordos, de oxigênio, luz, os metais, a temperatura, e atividade da água, entre outros (Nawar, 1996; Deman, 1999).

O elevado teor de PUFA no pescado aumenta a taxa de oxidação, uma vez que o aumento do casal ligações acelera a oxidação (Flick *et al.*, 1992, Nawar, 1996).

A oxidação lipídica em peixes é um grande problema de qualidade, pois a redução da vida de prateleira através produção sabores e cor e textura modificados (Lie, 2001).

Neste trabalho, o valor de TBA aumentou com o tempo de armazenamento, como se pode verificar na figura 4.3. No dia zero ocorreu alterações no TBA (figura 4.3). Poderá verificar-se, assim, que já tinha ocorrido a rancidez oxidativa, ou seja, o oxigênio reage com os lípidos insaturados, formando-se hidroperóxidos, decompondo-se em substâncias que conferem o sabor característico de ranço (Ogawa, 1999).

O valor máximo admissível do TBA é de 4 mg/kg segundo a norma NP 3356/1990. Verifica-se assim, com os dados obtidos da amêijoia, que ocorreu uma elevada oxidação lipídica nas amêijoas desde o início do seu armazenamento que pode-se justificar pela interferência vários factores mencionados por Nawar (1996) e Deman (1999), nomeadamente perfil de ácidos gordos, oxigénio, luz, metais, temperatura e atividade da água.

Além disso, o que poderá surgir é que a amêijoia estudada podia ter alguns dias de conservação antes da realização do presente estudo.

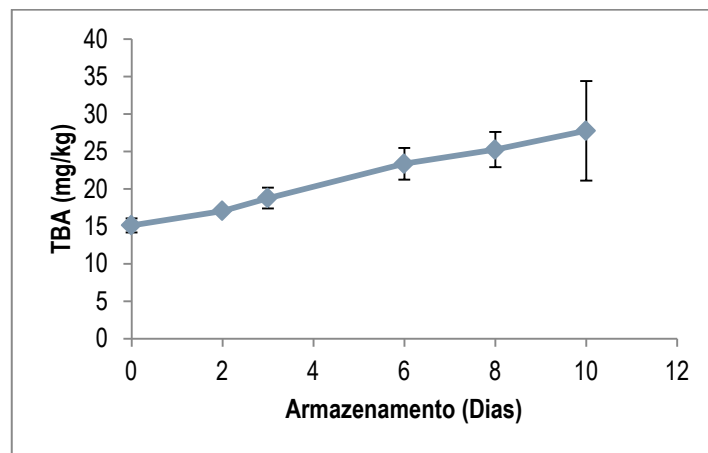


Figura 4.3. Valores de TBA da amêijoia-boia durante 10 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$)

4.4. Avaliação microbiológica

Segundo Harrigan (1998), as bactérias responsáveis pela degradação do marisco são provenientes de esgotos, de habitats estuarinos e costeiros, e pode resultar na concentração de organismos no intestino humano, tais como a *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*.

Descrito por vários autores nomeadamente Wallace *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2000; Croci *et al.*, 2001, na microflora do ambiente marinho existem várias espécies de *Vibrio*, que incluem organismos patogénicos para os seres humanos. Por isso, é essencial verificar a existência destes microrganismos na amêijoia-boia.

4.4.1. Pesquisa de *Salmonella spp*

Durante os dez dias de armazenamento observaram-se colónias típicas de *Salmonella spp* em 25g de amêijoas. Realizou-se a confirmação em meio Kligler onde se apresentaram as seguintes definições: cunha rosada (lactose -), fundo amarelo (glucose +), fundo negro (H₂S+), produção de gás e crescimento ao longo da sementeira. A confirmação não foi totalmente completa, uma vez que não se realizou os testes bioquímicos da galeria API 20E.

Os limites legais estabelecidos no regulamento (CE) n.º 1441/2007 da comissão de 5 de dezembro de 2007 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, ausência de *Salmonella* em 25 g do alimento

Estes resultados indicam que a amêijoas é um alimento muito suscetível. Segundo Popoff *et al* (2004), a *Salmonella* é responsável pela ocorrência de mais surtos de doenças transmitidas por alimentos do que qualquer outra bactéria. Segundo Bean *et al.* (1997) nos Estados Unidos mostrou que 7,4% dos surtos foram associados com o consumo de peixe ou marisco. O isolamento de sorotipos de *Salmonella* de moluscos vivos dos ambientes marinhos tem sido relatado a partir da região da Galiza de Espanha (Martinez-Urtaza *et al.*, 2003).

4.4.2. Pesquisa de bactérias Coliformes e pesquisa provável de *E.coli*

A presença de *Escherichia coli* nos alimentos indica que existe contaminação fecal e uma possível presença de patogénicos entéricos (US Food & Drug Administration, 1992; Veigas, 2009).

Neste estudo, as bactérias coliformes totais, fecais e *E. coli* durante os dez dias de armazenamento das amêijoas em refrigeração apresentaram valores inferiores a 230 NMP/100g de carne e de líquido intravalvar, que corresponde ao limite legal estabelecido pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da comissão de 5 de dezembro de 2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (*E. coli* ≤ 230 NMP/100 g de carne e de líquido intravalvar do alimento).

Veja qual o valor de *E.coli* no novo regulamento e diga qual foi o seu valor e compare com o seu valor.

4.4.3. Pesquisa *Vibrio sp.*

Neste trabalho observou-se colónias típicas de *Vibrio sp* nas amêijoas durante os 10 dias de armazenamento. Estes resultados foram confirmados através de testes da oxidase, Gram e exame microscópico da forma e motilidade do *Vibrio*. Inoculou-se as colónias suspeitas em blood agar base nº2, com exceção do segundo dia estudado, uma vez que a sua confirmação foi negativa. Essa exceção pode-se justificar, uma vez que as amêijoas apresentavam-se agrupadas no recipiente durante o armazenamento e a seleção para a amostragem ter sido completamente aleatória.

A confirmação não foi totalmente completa, uma vez que não se realizou os testes bioquímicos da galeria API 20E.

Estes resultados podem ser explicados através do estudo Gooch (2002) que, apesar do crescimento do *Vibrio spp.* nos bivalves possa ser inibido pelas temperaturas de refrigeração, as bactérias podem multiplicar-se rapidamente desde que estas sejam expostas a temperaturas elevadas (> 25°C).

5. Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo mostra uma variação sazonal em relação aos dados biométricos. Com as determinações efetuadas neste estudo, pode-se concluir que no verão, as amêijoas apresentam um maior comprimento. Contudo, as amêijoas capturadas no inverno apresentam um peso superior.

Em relação à composição nutricional, o estudo não apresentou diferenças significativas na variação sazonal, com exceção da humidade que revelou ser mais elevada no inverno do que em relação às outras estações, nas amêijoas *Ruditapes decussatus*.

Durante o processo de análise ocorreram algumas oscilações nos parâmetros estudados que podem ter sido influenciados por diversos fatores como a temperatura da água, a salinidade, a maturidade sexual, as correntes de água, a exposição ao ar e o oxigénio. Neste estudo observou-se que os teores de contaminantes ambientais estudados nas amêijoas analisadas estiveram abaixo dos limites máximos permitidos pela legislação. Os resultados obtidos nestas condições experimentais não permitiram estabelecer um tempo de prateleira das amêijoas em refrigeração (± 5 °C) durante os dez dias após a determinação do valor de pH, ABVT, TBA, da pesquisa de *E. coli*, na pesquisa de *Salmonella* e na pesquisa de *Vibrio*, pelo facto de não ter sido possível confirmar os parâmetros microbiológicos.

No entanto neste estudo poderá concluir-se que as amêijoas são um produto muito perecível e que o seu armazenamento em refrigeração poderá não é suficiente para assegurar a qualidade alimentar. Contudo, este estudo deveria ter sido realizado também no, no outono, de modo a conseguirmos comparar as quatro estações do ano e em anos diferentes, uma vez que ocorrem oscilações nas temperaturas da água e disponibilidade de alimento em cada ano. Além de aumentar o número de amostras analisadas, para as conclusões dos resultados serem mais consistentes.

Outro ponto interessante seria completar a avaliação com uma maior diversidade de minerais e verificar existência de outros metais pesados nas amêijoas.

Seria necessário mais dados experimentais, para reforçar o tratamento estatístico de resultados.

Numa perspectiva futura, era importante o desenvolvimento deste outros estudos sobre a avaliação nutricional e estabilidade da amêijoa aplicando tratamentos como por exemplo: tratamento de alta pressão, embalagem em atmosfera controlada, conservação química (antioxidantes naturais), e recurso agentes de biopreservação.

6. Bibliografia

- Anibal, J., Esteves, E., Rocha, C. (2011). Seasonal variation in cross biochemical composition, percentage edibility and condition index of the clam *Ruditapes Decussatus* cultivated in the Ria Formosa (South Portugal), *Journal of Shellfish Research*. 30(1): 17-23
- Ackman, R. G. (1983). Fatty acid metabolism of bivalves. *Proc. 2nd International Conference Aquaculture Nutrition.*, Pruder, G. D.; Langdon, C.; Conklin, D., eds. World Mariculture Society, Special Publications. 2: 358-376.
- Ackman, R. G. (1995). Composition and Nutritive Value of Fish and Shellfish Lipids. Canadian Institute of Fisheries Technology, Technical University of Nova Scotia, Halifax, Nova Scotia, Canada. 117-146
- Ahmed, F.E.(Ed.) (1991). *Seafood safety*. National Academy Press, Washington D.C., USA.
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 146, 241-249.
- Almeida, M.D.V., Afonso C.I.P.N. (2001). *Princípios Básicos de Alimentação e Nutrição*. Universidade Aberta. Lisboa. 47-86.
- ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). (2009). Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. <http://www.fipa.pt/userfiles/file/i005411.pdf> Acedido em 03/10/2013
- Barber, B.J., Blake, N.J. (1985). Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say), as indicated by ¹⁴C incorporation. *Biological Bulletin*. 168, 39-49.
- Bargagli, R. (2000). Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 166, 129-173.
- Bayne, B.L.; Newell, R.C. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. In: Saleuddin, A.S.M.; Wilbur, K.M. (eds). *The mollusca*. Vol. 4. New York: Academic Press. 407-515.
- Bean, N.H., Goulding, J.S., Daneils, M.T. and Angulo, F.J. (1997) Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988–1992. *Journal of Food Protection*. 60, 1265-1286.
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A. (1998). Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Science of the Total Environment*. 214, 123-131
- Bell, M.V., Henderson, R.J., Sargent, J.R. (1986). The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83B, 711-719.
- Beninger, P.G.; Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a

- common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 79:19-37.
- Bligh, E. G & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917
 - Boss, C.B. & Fredeen, K.J. 1989 – Concepts, instrumentation, and techniques in *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*. Perkin Elmer, USA.104.
 - Brands D.A., Inman A.E., Gerba C.P., Maré C.J., Billington S.J., Saif L.A., Levine J.F., Joens L.A. (2005). Prevalence of *Salmonella* spp. In oysters in the United States, *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, N. ° 2, 893–897.
 - Brenner, D.N. (1984) In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 408-420.
 - Burkhardt, W., III, Watkins, W. D., & Rippey, S. R. (1992). Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by *Mercenaria mercenaria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(3), 826- 831.
 - Burkhardt, W., III, & Calc i, K. R. (2000). Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (4), 1375-1378 .
 - Butt, A. A., Aldridge, K. E., & Sanders, C. V. (2004). Infections related to the ingestion of seafood part I: viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 4 (4), 201-212.
 - Canesi, L., Pruzz o, C., Tarsi, R., Gallo, G. (2001). Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. leading to efficient bacterial clearance. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 464- 468.
 - China B., De Schaetezen M.-A., Daube G. (2003). Les mollusques bivalves, des aliments dangereux? *Annales de Médecine Vétérinaire*. 147, 413-422.
 - Chironna, M., Germinario, C., De Medici, D., Fiore, A., Di Pasquale, S., Quarto, M., Barbuti, S. (2002). Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy). *International Journal of Food Microbiology*. 75, 11-18.
 - Chora, S., McDonagh, B., Starita-Geribaldi, M., Roméo, M., Bebianno, M.J. (2008). Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative-stress in *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*. 66, 95–97.
 - Chu, F. E.; Greaves, J. (1991). Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crossostrea virginica*. *Marine Biology*. 110:229-236.
 - Comissão Europeia. (2013). A pesca e a Aquicultura na Europa, n.º 60 Março 2013 http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/magazine/mag60_pt.pdf Acedido em 03/10/2013
 - Crompton, T.R.(1997). *Toxicants in Aqueous Ecosystem*. John Wiley and Sons, Chichester, New York. 194.
 - Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E., Toti, L. (2001). Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Letters in Applied Microbiology*. 32, 57 – 61.

- Csuros, M. & Csuros, C. (2000). *Environmental sampling and analysis for metals*. Lewis Publishers, USA. 372.
- Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShanII, A.L., Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M.A., Puhr, N.D., Wells, J.G., Angulo, F.J. (2000). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. *Journal of the American Medical Association*. 284,1541-1545.
- DeMan, J.M. (1999a). Lipids, in *Principles of Food Chemistry*, p. 54-63. Aspen Publishers, Inc. Maryland, USA.
- Deepanjali, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 3575–3580.
- Delgado, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J. (2004). The role of lipids in the gonadal development of the clam *Ruditapes decussatus* (L.). *Aquaculture*. 241 (1–4), 395-411.
- Delgado, M. & A. Pérez-Camacho. (2007). Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Scientia Marina*. 71:471-484.
- Deman, J.M. (1999). Lipids, in *Principles of Food Chemistry*, p. 54-63. Aspen Publishers, Inc. Maryland, USA.
- Despacho N.º 14515/2010 Ao abrigo do Decreto-Lei n.º 113/2006, de 12 de Junho em conjugação com os n.ºs 1 e 2 do artigo 3.º da Portaria n.º 1421/2006, de 21 de Dezembro, a Presidente do Conselho Directivo do INRB, I. P., estabelece a seguinte classificação das zonas de produção de moluscos bivalves vivos.
- Determinação da humidade. Processo de referência, NP 2282/1991 (1991).
- Determinação da Proteína bruta. Alimentos para animais. NP 2030/1996 (1996).
- Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.). Método espectrofotométrico. NP 3356/1990 (1990).
- Determinação do teor de azoto básico volátil total (A.B.V.T.). Método de Conway, NP 2930/1988 (1988).
- Determinação do teor de cinza, NP 2032/1988 (1988).
- Determinação do teor total de fósforo. Método espectrofotométrico, NP 4495/2010 (2010).
- Diniz, M. (1998). A aquacultura pp. 13-15 in: HENRIQUES, M. A. R. (Ed). *Manual de Aquacultura*. Departamento de Produção Aquática, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Port. 207.
- DGPA. (2013). Recursos da Pesca série estatística, Ano 2012, Direção Geral das Pescas e Aquicultura, Lisboa, Vol. 25 A-B, pp. 1-182.
- Dyer, W.J., Fraser Hiltz, D., Hayes, E.R. and Munro, V.G. (1977). Retail frozen fishery products –Proximate and mineral composition of the edible portion. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 10, 185-190.

- Eyles, M.J., Davey, G.R. (1984). Microbiology of commercial depuration of Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. Journal of Food Protection. 47, 703-706.
- FAO, Culture Aquatic Species Information Programme, *Ruditapes decussatus*. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_decussatus/en#cNA014C Acedido em 18/08/2013
- FAO, 2013 a. Aquaculture systems. http://www.fao.org/fishery/collection/glossary_aquaculture/en Acedido em 28/08/2013.
- [FDA] Food and Drug Administration. (2009). National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2009 Revision <http://www.fda.gov>
- Ferreira, F. A.G. (1994). Nutrição Humana. 2ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa
- Figueira, E., Lima, A., Branco, D., Quintino, V., Rodrigues, A.M., Freitas, R. (2011). Health concerns of consuming cockles (*Cerastoderma edule* L.) from a low contaminated coastal system. Environment International .37, 965-972
- Fletcher, A.M. (1989) *Eat Fish, Live Better*. Hrper & Row, Publishers, New York. 378.
- Flick, G.J., Hong G-P., and Knobl, G.M. (1992). Lipid Oxidation of Seafood During Storage in Lipid Oxidation in Food, A.J.S. Angelo (Ed.), p. 183-205. ACS Symposium Series 500. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Formiga-Cruz, M., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Henshil-wood, K., Hernroth, B.E., Jofre, J., Lees, D.N., Lucena, F., Papapetropoulou, M., Rangdale, R.E., Tsibouxi, A., Vantarakis, A., Girones, R. (2003). Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. Applied and Environmental Microbiology. 69, 1556 – 1563.
- Freeman, D.W., and Hearnberger, J.O. (1993). An instrumental method for determining rancidity in frozen catfish filets. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2(1): 35-50.
- Gabbott, P.A. (1976). Energy metabolism. In: Bayne, B.L. (Ed.), Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge. 29
- Galap, C., Le Boulenger, F., Grillot, J.P. (1997). Seasonal variations in biochemical constituents during the reproductive cycle of female dog cockle *Glycymeris glycymeris*. Marine Biology. 129, 625-634.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J. (2002). Effect of Cd on antioxidant enzymes in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers. 7, 242–256.
- Giese, A.C. (1969). A new approach to the biochemical composition of the mollusc body. Oceanogr. Marine Biology. 7, 175 – 229.3- 335.
- Gillespie, I.A., Adak, G.K., O'Brien, S.J., Brett, M.M., Bolton, F.J. (2001). General outbreaks of infectious intestinal disease associated with fish and shellfish, England and Wales, 1992–1999. Communicable Disease Public Health. 4, 117-123.
- Gonçalves, A. (2010). Qualidade e valorização em Aquacultura, Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves. Tese de

- Doutoramento em Farmácia (bromatologia), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Portugal.
- Gooch, J.A., DePaola, A., Bowers, J., Marshall, D.L. (2002). Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*. 65, 970-974.
 - Goyer, R. A., Clarkson, T. W. (2001). Toxic effects of metals. In: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, C. D. Klaassen (Ed.), McGraw-Hill, New York USA. 811-867.
 - Gözler, A. M., A. N. Tarkan. (2000). Reproductive biology of *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in Çardak Lagoon, Dardanelles Strait. *Turk. Journal of Marine Science*. 6:175-198.
 - Gram, L.; Huss, H.H (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 121-137.
 - Haard, N.F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*. 25, 289-307.
 - Harrigan, W. F. (1998). Laboratory methods in food microbiology. 3rd Ed. Academic Press. San Diego. 229-233 in Puglia region (South Italy). *International Journal of Food Microbiology*. 75, 11 – 18.
 - Henriques, M.A.R. (1998). Manual de Aquicultura (1ª ed.). Departamento de Produção Aquática. Instituto de ciências biomédicas. 11-76.
 - Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R., & Allard, A. K. (2002). Environmental factors in influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (9), 4523-4533.
 - Ho, B. S. W., & Tam, T. Y. (2000). Natural depuration of shellfish for human consumption: a note of caution. *Water Research*. 34 (4), 1401-1406.
 - Holland, D.L. 1978). Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In: Malins, D.C., Sargent, J.R. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London. 85-123.
 - Hood, M.A., Ness, G.E., Rodrick, G.E., Blake, N.J. (1983). Effects of storage on microbial loads of two commercially important shellfish species, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria campechiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45, 1121-1128.
 - Howgate, P. (2009). Traditional methods. In: *Fishery products: quality, safety and authenticity*, Rehbein, H.; Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, United Kingdom. 19-41.
 - Huss, H.H. (Ed). (1995). *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fish. Technical Papers. 348. FAO Rome. Italy.
 - 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. 413-430.

- IPIMAR. (2008). Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal. Silva, H.A.; Batista, I. Eds. Publicações Avulsas do IPIMAR, 20, Lisboa. 171.
- Jhaveri, S.N., Karakoltsidis, P.A., Montecalvo, J. and Constatinides, S.M. (1984) Chemical composition and protein quality of some Southern New England marine species. *Journal of Food Science*. 49, 110-113.
- Joseph, J.D. (1982). Lipid composition of marine and stuarine invertebrates: Part II. Mollusca. *Progress in Lipid Research*. 21, 109-153.
- Kaspar, C.W., Tamplin, M. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(8): 2425-2429.
- Klein, G. L. (2005). Heavy Metals. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2nd Ed. Caballero, B., Allen, L., Prentice, A. (Eds.) Elsevier Academic Press, Oxford. 344-350.
- Ketata, I., Smaoui-Damak, W., Guermazi, F., Rebai, T., Hamza-Chaffai, A. (2007). In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146, 415-430. *Microbiology*. 59, 2425- 2429.
- Laing, I., Utting, S.D., Kilada, R.W.S. (1987). Interactive effects of diet and temperature on the growth of juvenile clams. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 113, 23-38.
- Langston WJ, Bebianno MJ. (1998). Metal handling strategies in molluscs. In: *Metal Metabolism in the Aquatic Environment*. Chapman and Hall, pp. 219-83
- Lall, S.P. (1989). Minerals. In: Halver, J.E. (ed.) *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego. 220-257.
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*. 59, 81 – 116.
- Liang L.N., He B., Jiang G.B., Chen D.Y., Yao Z.W. (2004). Evaluation of mollusks as biomonitors to investigate heavy metal contaminations along the Chinese Bohai Sea, *Science of the Total Environment*. 324, 105-113.
- Lie, Ø. (2001). Flesh quality- the role of nutrition. *Aquaculture Research*. 32: 341-348.
- López-Artiguez, M., Soria, M.L. and Repetto, M. (1989). Heavy metals in bivalve molluscs in Huelva estuary. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 41, 625-642
- Maitre-Allain, T. (1982). Influence du milieu sur la croissance de deux palurde *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum*, dans l'étang de Than (Hérault) (Environmental influence on the growth of the clams *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* in the basin of Than (Hérault)). *Vie Mar*. 4, 37-49.
- Martinez-Urtaza, J., Saco, M., De Nova, J., Perez-Pioneiro, P., Peiteado, J., Lozano-Leon, A. and Garcia-Martin, O. (2004) Influence of environmental factors and human activity on the presence of *Salmonella* serovars in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 2089-2097.

- Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K. (2000). Vogel's Quantitative Chemical Analysis (6th ed.), New York: Prentice Hall.351.
- Meneghetti, F., V. Moschino & L. Da Ros. (2004). Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture*. 240:473-379.
- Metian, M., Charbonnier, L., Oberhaensli, F., Bustamante, P., Jeffree, R., Amiard, J.-C.,Warnau, M.(2009). Assessment of metal, metalloid, and radionuclide bioaccessibility from mussels to human consumers, using centrifugation and simulated digestion methods coupled with radiotracer techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 1499-502.
- Mohite, S. A. & A. S. Mohite & H. Singh. (2009). On condition index and percentage edibility of the shortneck clam *Paphia malabarica* (Chemintz) from estuarine regions of Ratnagiri, west coast of India. *Aquaculture Research*. 40:69-73.
- Mossel & D.A.A. (1982). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie van Leeuwenhoek*. 48, 609-611.
- Murphree, R.L., Tamplin, M.L. (1995). Uptake and retention of *Vibrio cholerae*O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 3656-3660.
- Nawar, W.W. (1996). Lipids, in Food Chemistry, O.R. Fennema (Ed.). 225-320. Third edition. Marcel Decker Inc, New York, USA.
- Nettleton, J.A.(1985). *Seafood Nutrition: Facts, Issues and Marketing of Nutrition in Fish and Shellfish*. Osprey Books, Huntington, New York.26.
- Ogawa M, Maia, E L (1999). Manual de pesca - Ciências e Tecnologia do pescado, Volume 1. Livraria Varela, São Paulo. 29-187.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L., Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*. 238, 451-468.
- Oliver, J.D. (1989). *Vibrio Vulnificus*. In: Doyle, M.P. (ed) Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York.569-600.
- Pacquit A., Lau K. T., McLaughlin H., Frisby J., Quilty B. and Diamond D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta*, pp. 69,515-520.
- Parker, S.P. (1982). "Synopsis and classification living organisms". McGraw-Hill (ed.) I and II vol, New York.
- Pesquisa *Salmonella*. Norma ISO 6579/2002 (2002).
- Pesquisa *Vibrio parahaemolyticus*. Norma ISO 8914/1990 (1990).
- Pérez Camacho, A., Delgado, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U. (2003). Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Ecology Progress Series*. 258, 133-145.
- Pigott, G.M. and Tucker, B.W.(1990) *Seafood Effects of Technology on Nutrition*. Marcel Dekker, Inc., New York.41 – 42.

- Popoff, M.Y., Bockemuhl, J. and Gheesling, L.L. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*.155, 568-570.
- Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos - Revisão. *Química Nova*.Vol. 29, No. 4: 755-760.
- Ramos-Gómez, J., Coz, A., Vigur i, J.R., Luque, A., Martín-Díaz, M.L., Ángel DelValls, T. (2011). Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. *Environmental Pollution*. 159, 1914 – 192 .
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) nº 1019/2008, da Comissão de 17 de Outubro que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à higiene dos géneros alimentícios.
- Richards, G. P. (1988). Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *Journal of Food Protection*. 51(3), 218-251.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A., Luzzi, I. (1999). Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 49, 43-48.2.
- Roméo, M., Gnassia-Barelli, M. (1997). Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* *Comparative Biochemistry and Physiology*. C 118, 33-37.
- Ruiter.A. (1994). Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability. Cab International, North America. 77-265.
- Ruiter, A. (1995). Contaminants in fish. In: A. Ruiter (ed.), Fish and fishery products composition, nutritive properties and stability, Cab internacional, UK. 261-285.
- Robertson, L. J. (2007). The potential for marine bivalve shell fish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review.*International Journal of Food Microbiology*. 120 (3), 201-216.
- Sagoo, S. K., Little, C. L., & Greenwood, M. (2007). Microbiological study of cooked crustaceans and molluscan shellfish from UK production and retail establishments. *International Journal of Environmental Health Research*.17, 219-230.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1990). Polyunsaturated fatty acids in marine and terrestrial food webs. In: Mellinger, J. (Ed.), *Animal Nutrition and Transport Processes: 1. Nutrition in Wild and Domestic Animals*. *Journal of Comparative Physiology*. Basel, Karger. Vol. 5, 11-23.
- Sargent, J. R. The structure, metabolism and function of lipids in marine organisms. In: Malins, D. C.; Sargent, J. R. (1978). eds. *Biochemistry and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, Vol. 3. London: Academic Press. 149-212.

- Sargent, J.; Henderson, R. J.; Tocher, D. R. (1988). The Lipids. In: Halver, J. E., ed. Fish Nutrition. London: Academic Press, pp. 154-218
- Sastry, A.N. (1979). Pelecypoda (excluding Osteidae). In: Giese, A.C., Pearse, J.S. (Eds.), Reproduction of Marine Invertebrates, vol. 4. Academic Press, New York. 113-292.
- Serafim, A., Bebianno, M.J. (2007). Kinetic model of cadmium accumulation and elimination and metallothionein in response in *Ruditapes decussatus*. Environmental Toxicology and Chemistry. 26, 960-969.
- Serafim, A., Bebianno, M.J. (2010). Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. Aquatic Toxicology. 99, 370-378.
- Serdar, S. & A. Lök. (2009). Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet shell clam *Tapes decussatus*, Linnaeus 1758 in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. Aquaculture. 293:81-88.
- Setti I., Rodriguez-Castro A., Pata M.P., Cadarso-Suarez C., Yacoubi B., Bensmael L., Moukrim A., Martinez-Urtaza J. (2009). Characteristics and Dynamics of Salmonella contamination along the coast of Agadir, Morocco, Applied and Environmental Microbiology. Vol. 75, N.º24, 7700-7709.
- Sidwell, V.D., Loomis, A.L., Loomis, K.J., Foncannon, P.R. and Buxxell, D.H. (1978) Composition of the edible portion of raw (fresh or frozen) crustaceans, finfish, and mollusks. III. Microelements. Marine Fisheries Review. 40(9), 1-20.
- Silva H.A., Batista I. (Eds.). (2008). Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR. 20, pp.171.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. (2007). Principles of Instrumental Analysis. 6th edn. Thomson Brooks/Cole. Canada. 690.
- Smaoui-Damak, W., Rebai, T., Berthet, B., Hamza-Chaffai, A. (2006). Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus*? A one-year case study. Comparative Biochemistry and Physiology. 143, 252–261.
- Smaoui-Damak, W., Berthet, B., Hamza-Chaffai, A. (2009). In situ potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72, 1489-1498.
- Sokolova, I.M. (2004). Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm. *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). The Journal of Experimental Biology. 207, 2639-2648.
- Son, N.T., Fleet, G.H. (1980). Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, relaying and storage. Applied and Environmental Microbiology. 40, 994-1002.
- Sousa J. et al. (1999). Riscos dos agentes biológicos: manual de prevenção, Lisboa: IDICT, Segurança e Saúde no Trabalho, Informação Técnica, pp. 10.
- Tabela da composição dos alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa 2006. <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailheAlimento.aspx?ID=IS907> Acedido em 01/08/2013

- Tapia J., Vargas-Chacoff L., Bertrán C., Carrasco G., Torres F., Pinto R., Urzúa S., Valderrama A., Letelier L. (2010). Study of the content of cadmium, chromium and lead in bivalve molluscs of the Pacific Ocean (Maule Region, Chile), Food Chemistry. 121, 666–671.
- Teeny, F.M., Gauglitz, E.J., Jr, Hall, A.S. and Houle, C.r.(1984) Mineral composition of the edible muscle tissue of seven species of fish flesh. Journal of American Dietetic Association. 36,212-215.
- Thurston, C.E. and Osterhaug, K.L. (1960) Sodium content of fish flesh. Journal of the American Dietetic Association. 36,212-215.
- Timoney, J.F., Abston, A. (1984). Accumulation and elimination of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by hard clams in an in vitro system. Applied and Environmental Microbiology. 47, 986-988.
- U.S. Food and Drug Administration (1992). The Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Vasconcelos, G.J., Lee, J.S. (1972). Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. Applied Microbiology. 23, 11-16.
- Viegas, S.J (2009). Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação: Contaminação microbiológica dos alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Lisboa. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância. 32. il
- Wallace, B.J., Guzewich, J.J., Cambridge, M., Altekus e, S., Morse, D.L. (1999). Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980–1994. American of Journal Preventive Medicine.17, 48-54
- Wang, Z., Yan, C., Vulpe, C.D., Yan, Y., Chi, Q. (2012). Incorporation of in situ exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. Marine Pollution Bulletin. 64, 90-98.
- Wilson, R.P. (2002). Amino Acids and Proteins. Fish Nutrition, Third Edition. Elsevier Science. USA. 144-179.
- WHO (2008). Foodborne Disease Outbreaks: Guidelines for Investigation and Control.7, 48-54.
- WHO. (2010). In G. Rees, K. Pond, D. Kay, J. Bartram, & J. Santo Domingo (Eds.), Safe management of shellfish and harvest waters (1st ed). (pp. 360). London, UK: IWA Publishing
- Urrutia, M.B., Ibarrola, I., Iglesias, J.I.P., Navarro, E., 1999. Energetics of growth and reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussatus* from Urdabai Estuary (Basque Country, N. Spain). Journal of Sea Research.42, 35-48.
- Zampini, M., Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Tarsi, R., Gallo, G., Pruzzo, C.(2003). Role for mannose-sensitive hemagglutinin in promoting interactions between *Vibrio cholerae* El Tor and mussel hemolymph. Applied and Environmental Microbiology. 69, 5711-5715.