



***Conservação de bacalhau salgado seco em
condições de abuso de temperatura***

Márcia Isabel Mascote Caramalho

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

Dissertação de Mestrado realizado sob a orientação da Doutora Maria José Rodrigues
e co-orientação da Doutora Maria Manuel Gil e da Doutora Maria Jorge Geraldes
Campos

2014

Título: Conservação de bacalhau salgado seco em condições de abuso de temperatura

Copyright © Márcia Isabel Mascote Caramalho

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2014

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/ 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

É neste pequeno espaço que agradeço a todos os que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Não posso deixar de fazer um agradecimento especial às melhores vizinhas do mundo, Ana Augusto e Rita Sousa! Sem elas não teria chegado ao fim desta etapa! Vocês são as maiores!

Aos técnicos de laboratório, Cristina, Pedro e Vera e à “senhora da cozinha mais gira da ESTM” Sofia, obrigada pela vossa paciência e ajuda!

À minha orientadora, que me tem acompanhado e ensinado ao longo dos anos. Por me ter “contaminado” com o gosto de trabalhar em microbiologia, sem si também não teria conseguido!

Por fim agradeço ao Nuno pela paciência que teve...e tem! À Zolinha pelas horas de companhia ao meu lado no computador!

A ti Maria Inês.



RESUMO

Algumas empresas de produção de bacalhau salgado pretendem iniciar a comercialização no mercado africano e/ou aumentar o mercado neste continente. Contudo, a rede de frio é frequentemente escassa, implicando grandes perdas económicas para as empresas nacionais. É possível atrasar a degradação do pescado através, por exemplo, do seu embalamento em vácuo e até em atmosfera modificada. Como tal, pretendeu-se embalar o bacalhau salgado seco a vácuo, e sobretudo em atmosfera modificada, de forma a aumentar o seu período de vida útil de prateleira em condições de abuso de temperatura. Foram estudados diferentes tipos de embalagem: (i) apenas com ar, (ii) embalagem a vácuo [com e sem a adição de metabissulfito de sódio (E223)] e (iii) em atmosfera modificada (EAM), 20% de CO₂: 80% de N₂, com e sem adição de E223; todos os tipos em condições de abuso de temperatura (15, 25 e 35°C). O presente trabalho mostrou que o embalamento de bacalhau salgado seco a vácuo e, principalmente, em EAM poderá incrementar o tempo de vida útil de prateleira. A temperatura de armazenamento mais uma vez comprovou ser um fator crucial uma vez que a menores temperaturas de armazenamento, o bacalhau apresentou um aspeto mais favorável, e maior foi o período de conservação, independentemente do tipo de embalamento do produto. O E223 beneficiou o produto armazenado a temperaturas mais baixas, mas não aparentou introduzir melhorias no bacalhau conservado a temperaturas acima de 25°C. Em condições de abuso de temperatura (15, 25 e 35°C), a preferência dos consumidores recai sobre a EAM (80%N₂:20%CO₂).

Palavras-Chave: Bacalhau salgado (*Gadus morhua*); vácuo; embalagem atmosfera modificada; metabissulfito de sódio; aumento tempo de vida útil; abuso temperatura.



ABSTRACT

Some processing companies of salted cod are seeking to enter the African market and/or increase the market on this continent. However, the cold chain is frequently scarce, implying great economic loss to national companies. It is possible to retard spoilage of fish by, for example, applying packaging under vacuum or modified atmosphere. As such, it was intended to vacuum pack the dried salted cod, and especially in modified atmosphere, in order to increase their shelf life under conditions of temperature abuse. Different types of packaging were studied: (i) only with air, (ii) vacuum packaging [with and without addition of sodium metabisulphite (E223)] and (iii) modified atmosphere packaging (MAP), 20% CO₂: 80% N₂, with and without addition of E223, all three in conditions of abuse temperatures (15, 25 and 35°C). The present work showed that vacuum and especially MAP of salted and dried cod allows the increase of the preservation period. Once more the storage temperature proved to be crucial since at lower storage temperatures, cod presents a favorable appearance and has increased the stability period, regardless of the type of packaging of the product. The E223 benefits the product stored at lower temperatures but does not appear to make any difference in cod stored at temperatures above 25°C. Under conditions of temperature abuse (15, 25 and 35 ° C), consumer preference lies with the MAP (80% N₂: 20% CO₂).

Keywords: Salted cod (*Gadus morhua*); vacuum; modified atmosphere packaging; sodium metabisulphite; increased shelf life; temperature abuse.



ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INDICE GERAL	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância do pescado e do bacalhau na alimentação	1
1.2. Biologia e distribuição do bacalhau do Atlântico	2
1.3. Bacalhau salgado seco	2
1.4. Processamento bacalhau salgado seco	3
1.4.1. Sangria, evisceração, descabeçamento, escala e lavagem	3
1.4.2. Salga	4
1.4.3. Secagem	5
1.4.4. Seleção, Armazenamento e Embalagem	9
1.5. Qualidade dos produtos da pesca	9
1.6. Embalagens a vácuo e atmosfera modificada	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Matéria-prima	17
3.2 Etapa 1	17
3.3 Etapa 2	17
3.4 Etapa 3	17
3.5 Etapa 4	18
3.6 Etapa 5	18
3.7 Análise microbiológica	19
3.7.1 Enumeração de mesófilos halófilos aeróbios (com 16% de NaCl adicionado).....	19
3.7.2 Enumeração de mesófilos halófilos anaeróbios (com 16% de NaCl adicionado).....	20
3.7.3 Enumeração de estafilococos coagulase positivos.....	21
3.7.4 Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores.....	21
3.8 Análise sensorial	22
3.8.1 Teste de aceitabilidade.....	22

3.9 Determinação da cor	23
3.10 Determinação do pH	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Etapa 1.....	25
4.2 Etapa 2.....	26
4.3 Etapa 3.....	27
4.4 Etapa 4.....	28
4.5 Etapa 5.....	30
5. CONCLUSÃO	45
6.PERSPETIVAS FUTURAS	47
7. BIBLIOGRAFIA	49
8. ANEXOS	53
8.1 ANEXO I.....	54
8.2 ANEXO II.....	54
8.3 ANEXO III.....	55
8.4 ANEXO IV.....	55
8.5 ANEXO V.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da espécie <i>Gadus morhua</i>	2
Figura 2. Esquema representativo de etapas principais de secagem de pescado.....	7
Figura 3. Vetor de deslocação da cor nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 15°C.....	32
Figura 4. Alterações/evolução visual do bacalhau salgado seco durante os 30 dias armazenado a 15°C.....	33
Figura 5. Vetor de deslocação da cor nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 25°C.....	33
Figura 6. Alterações/evolução visual do bacalhau salgado seco durante os 30 dias armazenado a 25°C	34
Figura 7. Vetor de deslocação da cor nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 35°C	35
Figura 8. Alterações/evolução visual do bacalhau salgado seco durante os 30 dias armazenado a 35°C	35
Figura 9. Desvios de pH nos diferentes tipos de embalagem armazenadas a 15°C.....	36
Figura 10. Desvios de pH nos diferentes tipos de embalagem armazenadas a 25°C.....	37
Figura 11. Desvios de pH nos diferentes tipos de embalagem armazenadas a 35°C.....	37
Figura 12. Respostas aos inquéritos realizados referentes à temperatura de armazenagem de 15°C. O gráfico de barras indica a avaliação global de cada uma das amostras e o gráfico circular indica a preferência de compra	40
Figura 13. Respostas aos inquéritos realizados referentes à temperatura de armazenagem de 25°C. O gráfico de barras indica a avaliação global de cada uma das amostras e o gráfico circular indica a preferência de compra	41
Figura 14. Respostas aos inquéritos realizados referentes à temperatura de armazenagem de 35°C. O gráfico de barras indica a avaliação global de cada uma das amostras e o gráfico circular indica a preferência de compra	42



INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores que influenciam o tempo de vida útil de prateleira de produtos embalados em EAM.....	14
Tabela 2. Desenho experimental utilizado na etapa 5 à temperatura de 35°C (a), 25°C (b) e 15°C (c)	19
Tabela 3. Estudo de dois tipos de embalagem (vácuo e ar) de bacalhau salgado seco a duas temperaturas (24 e 30°C)	25
Tabela 4.a). Composição gasosa das embalagens de bacalhau salgado seco embalado a ar às temperaturas de 27±2, 4°C, 24, 30 °C	26
Tabela 4.b). Avaliação visual de bacalhau salgado seco embalado com ar às temperaturas de 27±2, 4°C, 24, 30 °C	27
Tabela 5.a). Composição gasosa das embalagens de bacalhau salgado seco embalado em atmosfera às temperaturas de 27±2, 4°C, 20, 30	28
Tabela 5.b). Avaliação visual de bacalhau salgado seco embalado em atmosfera modificada às temperaturas de 27±2, 4°C, 20, 30 °C	28
Tabela 6.a). Composição gasosa das embalagens de bacalhau salgado seco com E223 sujeito ou não a secagem e embalado a ar à temperatura de 20°C	29
Tabela 6.b). Avaliação visual de bacalhau salgado seco com E 223 sujeito ou não a secagem e embalado a ar à temperatura de 20°C	29
Tabela 7. Composição gasosa das diferentes embalagens armazenadas a 15, 25 e 35°C.....	31
Tabela 8. Contagem de estafilococos coagulase positiva, aeróbios e anaeróbios totais e esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras armazenadas a 15°C ao longo do tempo (T0:1 dia; T1:30 dias)	38
Tabela 9. Contagem de estafilococos coagulase positiva, aeróbios e anaeróbios totais e esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras armazenadas a 25°C ao longo do tempo (T0:1 dia; T1:30 dias)	38
Tabela 10. Contagem de estafilococos coagulase positiva, aeróbios e anaeróbios totais e esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras armazenadas a 35°C ao longo do tempo (T0:1 dia; T1:7 dias; T2: 15 dias).....	38



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABVT – azoto básico volátil total

ATP- Adenosina 5'-trifosfato

a_w- Atividade da água

E223- Metabissulfito de sódio

EAM- Embalagem de atmosfera modificada

INE- Instituto Nacional de Estatística

ISO- *International Standard Organization*

PA/PE- Poliamida/polietileno

PCA- *Plate count agar*

TMA – Trimetilamina



1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do pescado e do bacalhau na alimentação

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), os produtos da pesca apresentam um papel fundamental na cadeia alimentar mundial, proporcionando cerca de 12% das proteínas animais consumidas, e representa, em alguns países, a principal fonte de proteínas de origem animal (INE, 2013).

Do ponto de vista da alimentação humana, os produtos da pesca apresentam-se como uma das maiores fontes de proteínas, além da sua riqueza em sais minerais e vitaminas. Ao optar por um estilo de vida mais saudável, o consumidor, prefere pescado como uma alternativa saudável à carne (Huss, 1995), pelo que o papel do pescado na alimentação humana é cada vez mais reconhecido. Este alimento é assim nutricionalmente caracterizado por um elevado nível proteico, de fácil digestibilidade, baixo teor lipídico onde predominam os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (Venugopal et al. 1996).

Um tipo de pescado muito procurado e bastante consumido em Portugal e nos países de expressão portuguesa é o bacalhau. No que toca à produção e exportação de bacalhau, a Noruega (100-120.000 toneladas) e a Islândia (60 mil toneladas) detêm a maior cota do mercado enquanto Portugal e Espanha, seguidos pelo Brasil, são os maiores importadores deste produto (Thórarinsdóttir et al. 2010). Em Portugal, a exportação total nacional de bacalhau e produtos de bacalhau salgado seco em 2013 foi de 11 toneladas resultando em cerca de 53 milhões de euros (INE, 2013).

O bacalhau é bastante usado na cozinha tradicional portuguesa e é um dos alimentos mais consumidos e apreciados pelos portugueses, quer dentro do país como fora. De acordo com o INE, relativamente ao consumo humano de bacalhau seco, a última informação disponível é relativa a 2008. Em sequência, o consumo traduz-se numa capitação bruta de 4,2 kg/habitante ano. A informação disponibilizada diz respeito à capitação bruta de bacalhau salgado seco e outros peixes salgados secos e não de bacalhau salgado seco apenas. Essa desagregação não está disponível, mas considera-se que será muito aproximada, dado que em Portugal, os peixes salgados secos não detêm uma expressão elevada em comparação com o consumo de bacalhau. (INE, 2013).

1.2 Biologia e distribuição do bacalhau do Atlântico

O bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758) é um peixe demersal pertencente à família Gadidae, cujo “nome comercial” é bacalhau. É um peixe redondo, com corpo alongado, com a metade posterior fusiforme e coberto de escamas pequenas, exceto na zona da cabeça (figura 1). O maxilar superior é mais saliente que o inferior. Pode atingir os 2 metros de comprimento e 96 kg de peso. Consegue viver até aos 25 anos e a maturidade sexual é geralmente atingida entre os 2 e os 4 anos de idade, mas pode surgir apenas aos 8 anos no nordeste do Ártico. Possui coloração desde o cinzento ao verde, com manchas negras arredondadas no lado dorsal, com tons prateados na zona ventral é ainda visível uma linha lateral. O seu habitat estende-se desde a linha de costa até à plataforma continental (Zeng et al., 2010).

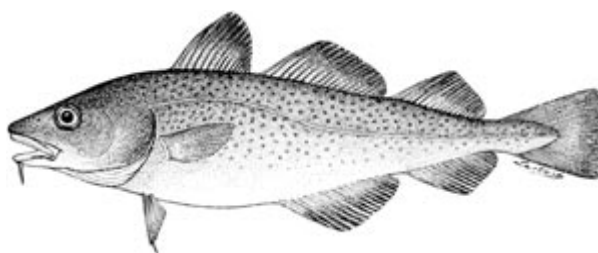


Figura 1 – Representação gráfica da espécie *Gadus morhua* (FAO, 1990).

1.3 Bacalhau salgado seco

O consumo de bacalhau sob a forma de bacalhau salgado seco predomina em Portugal sendo o consumo de bacalhau fresco pouco atrativo para a população portuguesa. Isto deve-se em muito a tradições seculares, em que a forma mais fácil de transporte e armazenamento deste produto era mediante a salga, uma vez que a refrigeração apenas surgiu no século XX, mantendo-se assim um produto estável microbiologicamente. Atualmente, a preferência por bacalhau salgado face ao bacalhau fresco, resulta do sabor, odor e textura característicos deste produto. Apesar das tradições seculares inerentes, a indústria de processamento de bacalhau foi-se adaptando à crescente importação e exportação da espécie e também às necessidades dos consumidores, surgindo produtos inovadores, especialmente o bacalhau demolhado ultracongelado e pratos pré-cozinhados

ultracongelados prontos a consumir. Esta adaptação da indústria em prol do consumidor, surge como resposta à menor disposição e disponibilidade do consumidor para planejar antecipadamente a refeição, em parte devido à crescente participação das mulheres no mercado de trabalho. Contudo, todo o desenvolvimento destes novos produtos baseou-se praticamente em conhecimento empírico, dada a escassez ou mesmo inexistência de conhecimento científico publicado. O interesse da indústria em compreender os processos tecnológicos e modernizá-los, especialmente as operações unitárias de salga e demolha cria uma vantagem competitiva, permitindo inovação a nível processual e qualidade do produto final (Salvador, 2009).

De acordo com o Decreto-lei nº25/2005 (DL, 2005) define-se como bacalhau salgado seco todo o bacalhau que tenha sido sangrado, eviscerado, descabeçado, escalado, lavado e que após maturação físico-química pelo sal, apresente um teor de sal igual ou superior a 16% (expresso em cloreto de sódio) e que após lavagem e posterior secagem por evaporação natural ou artificial, possua um teor de humidade inferior ou igual a 47%.

1.4 Processamento bacalhau salgado seco

1.4.1 Sangria, evisceração, descabeçamento, escala e lavagem

A evolução tecnológica a bordo dos barcos de pesca, aliada ao maior conhecimento dos movimentos migratórios do bacalhau, da natureza e profundidade dos fundos marinhos, a possibilidade de avaliar e monitorizar a temperatura e salinidade das águas, levou a que os métodos de pesca se fossem modificando ao longo dos tempos. O estudo da biologia deste peixe foi também fundamental para melhorar as suas formas de captura (Dias, 2013).

Atualmente sabe-se que a forma de captura e o tratamento posterior a bordo são fatores determinantes para a qualidade do pescado, sendo assim fundamental que se respeitem todas as boas práticas a bordo, uma vez que se trata de um alimento bastante perecível. Aquando a captura e acondicionamento do pescado, este deverá ser conservado nas melhores condições higiénicas, refrigerado em gelo ou mesmo sujeito a congelação. (Rodrigues, 2006).

Num dos tipos de pesca utilizado, a pesca à linha, a principal vantagem reside no facto do pescado poder ser imediatamente sangrado após a sua captura. O pescado sangrado entra mais rapidamente em rigidez cadavérica, do que aquele que é morto por asfixia, visto ter uma morte mais rápida, com contrações musculares que conduzem à produção de ácido

lático e conseqüentemente uma diminuição do pH, contrariando o desenvolvimento microbiano, dando origem a um pescado com qualidade superior (Dias, 2013).

O sangramento do bacalhau é não só importante para a sua conservação como também influencia o aspeto visual, que se torna escuro quando mal sangrado, devido à acumulação do sangue no músculo do peixe. Quando o sangramento não é realizado com eficácia o bacalhau tem tendência a apresentar um amarelecimento, devido à difusão do sangue que permanece pelos tecidos e que permanece mesmo depois de uma lavagem rápida (Dias, 2013).

Após o sangramento, que visa remover a maior quantidade de sangue possível, ocorre o descabeçamento, a evisceração e a escala.

A evisceração tem como principal objetivo eliminar as vísceras que armazenam fezes que incorporam bactérias e enzimas digestivas que deterioram o pescado. A evisceração do peixe deve ser concluída rapidamente e de forma segura, a fim de evitar resquícios de vísceras que mais tarde serão um veículo de contaminação microbiana. Aproveitam-se os fígados, para extração do óleo e as bexigas-natatórias, que são conservadas em sal, podendo ser utilizadas para o fabrico de cola, juntamente com a pele do bacalhau, ou na produção de samos. Hoje em dia, este processo efetua-se automaticamente com a ajuda de equipamento próprio para evisceração (Horne, 2001; Rodrigues, 2006; Dias, 2013).

Após a evisceração, o bacalhau pode ser então armazenado a frio (0-1°C), ou imediatamente congelado com cabeça, ou já descabeçado, mas sempre eviscerado. A qualidade do produto congelado dependerá da qualidade da matéria-prima. Um bacalhau inteiro que seja congelado até 3 dias após a captura, posteriormente pode ser manipulado como se tratasse de pescado fresco (Horne, 2001).

A escala do peixe é uma fase indispensável anterior à salga, pois vai permitir aumentar a superfície de lavagem e de contacto com o sal. O bacalhau é aberto longitudinalmente e são removidos dois terços da espinha dorsal sendo depois lavado de modo a remover todos os restos de sangue e vísceras. Após a lavagem, o peixe é colocado, e sobreposto, em pilhas a escorrer de modo a reduzir o teor de humidade antes da salga e seca (Rodrigues, 2006).

1.4.2 Salga

Atualmente utilizam-se diversas formas de conservação de pescado. No caso do bacalhau este tem sido comercializado de diversas formas desde congelado inteiro ou em

postas, refrigerado inteiro ou em postas ou no modo mais comum sob a forma de bacalhau salgado.

O principal objetivo da salga resume-se à alteração da composição do pescado através da diminuição do conteúdo em água, de modo a prolongar o período de conservação. Esta diminuição do teor de água é conseguida através da adição de sal ao alimento, processo este conhecido por salmoura (Rodrigues, 2006).

A penetração do sal e a saída de água do alimento denomina-se por processo osmótico, o qual cessa quando é atingido um equilíbrio entre o meio exterior (sal) e o interior (músculo do peixe), dizendo-se que se estabeleceu o equilíbrio osmótico do processo de salga, o que significa na prática, o seu fim. O período durante o qual o pescado permanece em contato com o sal em forma cristalina ou em solução salina concentrada (18 a 25% NaCl, m/m) é denominado por tempo de salga ou tempo de cura pelo sal (Bastos, 1988).

Ao fim de cerca de 2 a 8 semanas de salga, o bacalhau apresenta um teor de 15- 25% de sal (m/m) e uma percentagem de água de 50%, o que fomenta uma diminuição da atividade da água (a_w) para 0,70 a 0,75 e numa diminuição do pH do músculo de aproximadamente 7 para 6,5 (Salvador, 2009). Assim, consegue-se obter um alimento estável microbiológica e bioquimicamente durante vários meses ou até mesmo anos, quando cumpridas as condições corretas de conservação.

Fatores como a composição da salmoura, a forma ou espessura do bacalhau, o tempo de imersão na salmoura e a razão entre o volume de salmoura e a quantidade de peixe afetam a difusão do sal para o interior do músculo do pescado. A temperatura deve ser mantida baixa, cerca de 2-4°C, para minimizar o desenvolvimento microbiano (Aas et al., 2010; Thórarinsdóttir et al., 2010).

1.4.3 Secagem

A secagem é um processo que consiste na eliminação de grande quantidade de água do produto, de modo a desfavorecer o desenvolvimento de microrganismos e eliminar quase totalmente as suas atividades metabólicas. Apesar das vantagens da secagem, esta provoca mudanças químicas e físicas causando a digestão das proteínas através de desnaturação e transferência de calor e de humidade entre o meio e o produto a secar, e entre o centro do produto e a sua superfície, permitindo reduzir o teor de humidade e de a_w até níveis que podem variar entre 10% a 60% de teor de humidade, dependendo do tipo de secagem e de pescado (Chukwu & Shaba, 2009; Mol et al., 2010; Ortiz et al., 2013). Associada à salga, a secagem permite aumentar o potencial de conservação do bacalhau.

No processo de secagem, a lavagem é o primeiro passo a ser realizado de modo a retirar o excesso de sal superficial que existe no peixe sujeito à salga. Após esta operação o peixe é colocado a escorrer de forma a não chegar à câmara de secagem embebido em água, uma vez que a desagregação das fibras musculares é tanto mais intensa, quanto maior quantidade de água nas células. A secagem pode ser feita pela exposição ao ar livre (secagem natural) ou em estufas por processos mecânicos (secagem artificial). Este último processo de secagem permite controlar a temperatura e a humidade relativa do ar de modo a obter um produto com melhores características e qualidade controlada.

Um produto efetivamente seco é aquele em que o conteúdo de humidade residual é inferior a 25%, enquanto um produto parcialmente desidratado é o que contém uma humidade residual de cerca 50%. Horne (2001) designa como produto ótimo para consumo, um produto com uma percentagem de humidade compreendida entre os 35 e 40%. Na figura 2 estão representadas as principais etapas do processo de secagem de pescado.

A secagem natural só é eficaz quando a humidade relativa do ar é baixa, existe calor solar e movimentação do ar. O produto elaborado por este processo apresenta uma humidade média final da ordem de 50%, o que determina um tempo de conservação baixo e limitado. Além do tempo de prateleira baixo, a secagem natural ainda apresenta os seguintes inconvenientes:

- Está dependente de condições climáticas, o que impossibilita uma previsão da produção;
- Os processos de oxidação ocorrem com maior intensidade em virtude da exposição dos produtos ao ar, verificando-se reações de peroxidação, catalisadas pela radiação ultravioleta. A principal vantagem do processo de secagem natural consiste na utilização da energia solar gratuita (Bastos, 1988).



Figura 2 - Etapas principais de secagem de pescado. (Adaptado de Berkel, 2005; Arvanitoyannis & Kotsanopoulos, 2012).

O processo de secagem artificial é o mais utilizado e pode ser aplicado por diferentes métodos. As técnicas mais utilizadas são a secagem em estufas e a secagem com circulação de ar quente. É ainda possível efetuar-se secagem com recurso à liofilização mas como se trata de uma técnica extremamente dispendiosa não é utilizada no setor alimentar em particular no pescado seco.

Este clima artificial é caracterizado pelos seguintes fatores: temperatura, grau higrométrico e velocidade do ar.

As principais condições de secagem a controlar nos processos de secagem de pescado são a temperatura, velocidade e humidade do ar de secagem, dimensões do pescado e tempo de secagem. Deste modo é necessário adequar as condições de secagem ao longo do tempo. A adequação da temperatura e humidade do ar permitem obter um produto com uma melhor qualidade. A velocidade do ar é um parâmetro muito importante

devido à possível secagem superficial dos filetes de pescado, o que impede uma secagem eficiente do interior dos filetes. Neste tipo de secagem o bacalhau é colocado no interior de uma câmara ou túnel de secagem (cerca de 7 a 9 kg de peixe/m²), ficando sujeito a um clima artificial, esta operação tem uma duração de dois a quatro dias, dependendo do tamanho da matéria-prima, devendo ser descontínua (com períodos de repouso), e decorrer a temperaturas que oscilem entre os 18 e 21°C (secagem a baixas temperaturas), com uma percentagem de humidade relativa do ar que varie entre os 45 a 80% (Kilic, 2009; AIB, 2010; ; Kituu et al., 2010).

A temperatura possui um papel preponderante no processo de secagem, um pequeno aumento de temperatura poderá melhorar o rendimento global do processo de secagem (Rodrigues, 2006).

A humidade relativa do ar de secagem é importante por dois motivos: regula a taxa de secagem do pescado e influencia bastante o aspeto do produto final. Este processo deve ser efetuado em vários períodos, após os quais o bacalhau volta a ser empilhado e prensado com o objetivo de uniformizar a humidade interna dos tecidos. Uma forma de acelerar este processo consiste em utilizar equipamentos que permitem o controlo da pressão a realizar no pescado (Rodrigues, 2006).

No que diz respeito à velocidade do ar, esta não pode ser muito reduzida, de tal forma que a evaporação não aconteça e, por outro lado, não pode ser excessiva, pois pode ocorrer a cristalização do sal na superfície do bacalhau ou a formação de uma película à superfície do músculo, o que impede a saída da restante água do seu interior. Normalmente são utilizadas velocidades de cerca de 1,2 ms⁻¹ (Rodrigues, 2006; Kilic, 2009).

Os principais defeitos provocados por uma secagem incorreta são a formação de aberturas ou fendas, que conferem um aspeto rugoso ao pescado salgado, o aparecimento e distribuição irregular do sal à superfície do pescado, ou o enrugar do produto final (Rodrigues, 2006).

Sensorialmente o pescado seco caracteriza-se, na sua generalidade, por uma cor intensa, alguma rigidez dos tecidos apresentando uma textura característica. Devido à perda de água, poderá também apresentar algum brilho na superfície do produto e ainda a percepção de sal (Kilic, 2009) sendo estas as principais características organoléticas que os consumidores procuram em pescado seco.

1.4.4 Seleção, Armazenamento e Embalagem

A seleção do pescado, como o próprio nome indica, realiza-se com o intuito de selecionar o bacalhau por tamanho e qualidade, rejeitando os peixes que não cumpram os requisitos definidos para o produto final (AIB, 2010), assim é possível apresentar ao consumidor um produto com qualidade uniforme.

O peixe salgado depois de sujeito a secagem é devidamente acondicionado e colocado em paletes, numa câmara de refrigeração onde continua em maturação com temperatura (2-4°C) e humidade relativa do ar (55-60%). Durante o armazenamento, o controlo da temperatura e da humidade relativa do ar é necessária e adaptada de acordo com a atividade enzimática, atividade microbiana e não microbiana permitindo manter a estabilidade dos parâmetros físico-químicos e sensoriais de qualidade do produto. De forma a minimizar as alterações de peso é necessário um equilíbrio entre a a_w no peixe salgado e a humidade relativa do ambiente. (Dias, 2013)

Os principais fatores que podem influenciar a estabilidade durante a armazenagem são a temperatura e a humidade. Estes dois fatores são responsáveis pelos principais defeitos específicos e encontrados no bacalhau conservado: *Rouge* ou vermelho (bactérias halofílicas cromogéneas), “empoado” (fungo halófilo *S. epizoum*), odor desagradável e coloração anormal (Rodrigues, 2006).

1.5 Qualidade dos produtos da pesca

Atualmente, a procura de produtos alimentares com elevada qualidade nutricional e segurança alimentar por parte dos consumidores tem vindo a aumentar pelo que a indústria do pescado tem apostado em apresentar ao consumidor produtos com a qualidade exigida (Nguyen, 2007).

De acordo com a ISO 8402 (1994) o termo qualidade é definido como o conjunto de atributos e características de um produto ou serviço responsáveis pela sua capacidade para satisfazer as necessidades/exigências do utilizador.

A qualidade é determinada por diversos aspetos dos quais se pode destacar a higiene, o valor nutricional e dietético, a frescura, a facilidade de utilização pelo consumidor, as propriedades intrínsecas e a disponibilidade do produto (Nunes et al., 2007).

No caso do pescado, a frescura assume uma enorme relevância visto que é um dos principais critérios de aceitação. Os produtos da pesca, quando comparados com outros alimentos, são muito perecíveis. A deterioração dos produtos da pesca ocorre

principalmente como resultado da atividade bacteriológica e alterações químicas durante o processamento e armazenamento e inicia-se *post mortem*. Elevados valores de a_w , presença de compostos azotados de baixa massa molecular, tipo de proteínas e o baixo teor de tecido conjuntivo, bem como a natureza psicrófila da flora bacteriana, favorecem a ocorrência de um conjunto de alterações que rapidamente contribuem para a sua desvalorização ou até mesmo rejeição (Nunes et al., 2007). A ausência de O_2 nos tecidos, combinada com as reações químicas são os principais agentes de deterioração (Huss, 1995; Oehlschläger & Rehbein, 2009). As condições de armazenamento são também um importante fator que afeta a qualidade dos produtos da pesca (Huss, 1995; Provincial et al., 2010;). Os termos fresco e deteriorado constituem os pontos extremos de uma sequência de reações autolíticas e bioquímicas, que ocorrem imediatamente após a morte, de forma progressiva e gradual. Dada a poiquilotermia do pescado, o seu metabolismo e microrganismos endógenos encontram-se adaptados a temperaturas mais baixas quando comparados com os mamíferos (Huss, 1995).

Imediatamente após a morte, na fase de pré rigor que dura apenas algumas horas, o músculo do pescado contém quantidades elevadas de glicogénio, fosfocreatinina e adenosina 5'-trifosfato (ATP), que são dependentes do nível de esgotamento físico provocado pela captura e abate, dando ao pescado uma aparência flexível e elástica. Mais tarde o músculo contrai, devido à ligação irreversível e desordenada das principais proteínas contrácteis, miosina e actina (formando-se o complexo actomiosina), provocada pela diminuição dos níveis de ATP e aumento dos iões cálcio (Ca^{2+}), no sarcoplasma. Este processo altera as propriedades das proteínas e, conseqüentemente, a textura do músculo, que se torna duro, rígido e inextensível, caracterizando a fase de *rigor mortis* (Huss, 1995). Esta condição normalmente persiste por algumas horas ou por mais de um dia, seguindo-se a resolução do *rigor mortis*, que se caracteriza pela recuperação da flexibilidade do músculo, embora já não exista a elasticidade característica da fase pré rigor. Pensa-se que esta fase é induzida pela atividade de enzimas presentes no músculo, pois é coincidente com as alterações autolíticas, principalmente o catabolismo nucleotídico.

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

A crescente procura por produtos frescos aliada à necessidade de redução de custos associados aos processos de refrigeração, justifica a procura por tecnologias que permitam um aumento no prazo de vida útil dos alimentos possibilitando desta forma um transporte a longas distâncias mais económico (Provincial et al., 2010).

Considerando esta necessidade, a ciência e a indústria tem vindo a investir em estudos de formas alternativas de embalagem, como o recurso a embalagens em vácuo e em atmosfera modificada (EAM) (Goulas & Kontominas, 2006).

1.6 Embalagens a vácuo e atmosfera modificada

As EAM são vastamente utilizadas como um método de conservação dos alimentos providenciando um aumento substancial do período de vida útil dos produtos alimentares (Goulas & Kontominas, 2006).

O principal objetivo das EAM é estender o tempo de vida útil (Shelf life) dos produtos alimentares diminuindo as taxas de deterioração e ao mesmo tempo mantendo a segurança e a qualidade do produto (Zeuthen et al., 2003).

Na EAM o ar que se encontra no interior da embalagem é substituído por um gás ou por uma mistura gasosa predefinida. Assim que a mistura gasosa é colocada no interior da embalagem esta não pode ser alterada sem a destruição da embalagem. A composição do gás é assim alterada de acordo com as taxas de respiração do alimento e da permeabilidade do filme da embalagem (Phillips, 1996).

Existem diversos gases que podem ser usados neste tipo de embalagem: oxigénio, o azoto e o dióxido de carbono, apresentando cada um papel diferente na conservação dos alimentos (Phillips, 1996).

O oxigénio, o azoto e o dióxido de carbono são utilizados em diferentes combinações e proporções tendo em conta o produto alimentar e as necessidades do produtor e consumidor. A escolha e otimização das combinações e proporções dos gases são influenciadas pela microbiota natural do alimento, a sensibilidade do produto ao oxigénio e dióxido de carbono e a estabilidade da cor do alimento (Phillips, 1996), pretendendo-se sempre apresentar um produto com características frescas.

O oxigénio tem vários efeitos sobre os alimentos, permite manter a mioglobina na carne na forma oxigenada, oximioglobina, conferindo assim a cor característica “vermelho brilhante” desejada, sinónimo de frescura para o consumidor (Coles et al., 2011). A rancificação dos produtos pode ser possível devido a mecanismos oxidativos muito comuns

em produtos com um elevado teor de gordura, e que são desencadeados na presença de elevadas concentrações de oxigénio (Özogul et al., 2003).

Embora fosse sugerido que a atmosfera no interior da embalagem de qualquer produto EAM deva conter um nível reduzido de oxigénio (5-10%) existe sempre uma percentagem de oxigénio residual que se difunde dentro da embalagem durante o tempo de armazenamento, exceto em raros casos onde a embalagem é impermeável ao oxigénio (Phillips, 1996).

O nível reduzido de oxigénio permite a inibição do crescimento à superfície de bactérias anaeróbias, em particular do *Clostridium botulinum*. Não existe no entanto garantia que essas mesmas condições de anaerobiose se mantenham no interior do produto (Phillips, 1996).

O azoto é um gás inerte que tem sido amplamente utilizado como *packaging filler* de forma a prevenir o colapso das embalagens, como é o caso das embalagens de batatas fritas. No caso dos produtos embalados em EAM mais especificamente no caso da carne fresca embalada com elevadas concentrações de dióxido de carbono é comum ocorrer o colapso da embalagem devido à solubilidade do dióxido de carbono nos tecidos da carne (Coles et al., 2011).

O azoto é utilizado como um gás de enchimento devido à sua baixa solubilidade na água e lípidos quando comparado com o dióxido de carbono. Esta baixa solubilidade previne o colapso da embalagem e permite usufruir de todos os benefícios da adição de dióxido de carbono (Coles et al., 2011).

O azoto é também uma excelente alternativa ao oxigénio nas EAM uma vez que previne a rancificação e inibição do crescimento de microrganismos aeróbios (Coles et al., 2011).

O dióxido de carbono é o agente antimicrobiano mais utilizado nas EAM. A eficiência do dióxido de carbono é influenciada pelas concentrações iniciais e finais do gás, pela temperatura de armazenamento bem como pela microbiota inicial do produto (Arvanitoyannis, 2012).

Em concentrações elevadas, o dióxido de carbono reduz significativamente o crescimento bacteriano em diversos tipos de produtos alimentares. Em alguns casos este efeito antibacteriano pode ser acentuado, diminuindo a temperatura de armazenamento do produto (Arvanitoyannis, 2012).

No entanto, alguns estudos mostram que a eficácia do dióxido de carbono como agente antibacteriano não é universal e que depende da microbiota inicial do produto bem como das suas características (Arvanitoyannis, 2012).

As leveduras à medida que se desenvolvem produzem dióxido de carbono, o seu desenvolvimento é também estimulado por ambientes com elevadas concentrações de dióxido de carbono, assim, em alguns produtos onde as leveduras são o principal fatores de deterioração, este tipo de EAM pode não constituir uma boa alternativa (Phillips, 1996).

Alguns agentes patogénicos tais como o *Clostridium perfringens* e o *Clostridium botulinum* não são afetados pela presença do dióxido de carbono e o seu crescimento é estimulado pelas condições anaeróbias (Aas et al., 2010).

De um modo geral, o dióxido de carbono é mais eficaz em alimentos onde os microrganismos responsáveis pela sua deterioração são constituídos essencialmente por bactérias psicrotróficas e aeróbias gram-negativas (Arvanitoyannis, 2012).

A conservação da qualidade de um produto alimentar, durante o armazenamento, deve-se principalmente à inibição do desenvolvimento microbiano degradativo e na maioria dos casos, as condições escolhidas são as que reduzem ou inibem este desenvolvimento (Phillips, 1996).

A Tabela 1 mostra os principais fatores que influenciam o tempo de vida útil de prateleira nos produtos embalados em EAM.

No caso do pescado fresco embalado em EAM, elevadas concentrações de dióxido de carbono, podem resultar na dissolução de dióxido de carbono no músculo do pescado provocando deformação e/ou colapso da embalagem, bem como afetar a cor do produto final (Sivertsvik et al., 2002).

A redução do pH nos tecidos causa uma diminuição na capacidade de retenção de água promovendo a exsudação e conseqüentemente a diminuição do período de vida útil do produto (Sivertsvik et al., 2002).

Pastoriza et al. (1996) demonstraram que a pescada fresca embalada com 60% de dióxido de carbono apresentava o dobro do período de vida útil em comparação à pescada embalada só com ar. A EAM inibiu o desenvolvimento bacteriano, com a redução da formação de bases voláteis totais e trimetilamina, resultando numa extensão do tempo de vida útil até mais três semanas em relação á pescada conservada em gelo.

Tabela 1. Fatores que influenciam o tempo de vida útil de prateleira de produtos embalados em EAM (Adaptado de Phillips, 1996).

Fatores intrínsecos	Fatores extrínsecos
a_w	
pH	
Microbiota: (a) inicial (b) depois do processamento (c) que se desenvolve	Controlo da temperatura em todas as etapas
	Qualidade inicial do produto
	Produto final, isto é, combinação dos diferentes ingredientes na embalagem
	Tempo antes do embalamento
Nutrientes disponíveis	Composição inicial e final do gás
Concentração e tipo do conservante	Permeabilidade relativa do filme aos gases
Potencial redox	Proporção produto:gás
Ocorrência natural de compostos antimicrobianos	Pureza gasosa
Presença de esporos	

Atualmente muitos são os estudos que têm sido conduzidos sobre o efeito do vácuo e da EAM em produtos alimentares em especial na área do pescado (Goulas & Kontominas, 2007; Rotabakk et al., 2009; Aas et al., 2010; Provincial et al., 2010), no entanto existe pouca informação disponível sobre o embalamento de bacalhau salgado seco à posta em vácuo e em EAM.

2. OBJETIVOS

Alguma indústria pretende exportar bacalhau salgado seco para países africanos com rede de frio deficiente, assim, o objetivo global do presente trabalho consiste em aumentar o tempo de conservação de bacalhau salgado seco em condições de abuso de temperatura de refrigeração. Para tal, constituíram-se objectivos específicos o aumento do tempo de conservação do produto embalado a vácuo e em EAM (com e sem adição de metabissulfito de sódio (E223)). Para tal foram concretizadas as seguintes etapas:

- Etapa 1: Estudo da estabilidade de bacalhau salgado (verde) embalado a vácuo e, posteriormente, armazenado às temperaturas de 24°C e de 30°C.
- Etapa 2: Embalamento com ar de postas de bacalhau salgado seco armazenadas às temperaturas de 4°C, 24°C, 27°C e 30°C.
- Etapa 3: Efeito do EAM (20% CO₂:80% N₂) na conservação de postas de bacalhau salgado seco armazenadas a 4°C, 20°C, 27°C e 30°C.
- Etapa 4: Aplicação de metabissulfito de sódio (E223) em postas de bacalhau salgado seco.
- Etapa 5: Estudo da estabilidade sensorial e microbiológica de postas de bacalhau salgado seco armazenadas em vácuo e em EAM, com e sem E223, às temperaturas de 15°C, 25°C e 35°C.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

O bacalhau salgado seco e o bacalhau verde (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758) foram fornecidos pela empresa Constantinos, S.A., Torres Vedras, e transportados em postas (no interior de caixas de cartão) para a Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM) em Peniche.

3.2 Etapa 1

À chegada á ESTM, o bacalhau verde e salgado seco foram então embalados a vácuo e armazenados a duas temperaturas distintas 24°C e 30°C.

Para o embalamento a vácuo, todas as amostras foram acondicionadas em sacos de poliamida/polietileno (PA/PE) de 200x300/90 (Tecnopack S.A.,Portugal). Foi utilizada uma embaladora a vácuo (Anexo I) da marca HENKELMAN (Holanda), modelo Boxer série 42. Este equipamento possui uma bomba com capacidade de 021m³/h e uma percentagem de vácuo final de 99.8%.

De forma a simular a temperatura de armazenamento as amostras foram armazenadas em duas estufas, uma a 24°C [Heratherm IGS 400, ThermoScientific, EUA (Anexo II)] e outra a 30°C [Mettert UFE600, Alemanha (Anexo II)], Foram também embaladas amostras nas mesmas condições mas embaladas apenas com ar (controlo).

3.3 Etapa 2

Na segunda etapa do estudo apenas se utilizaram postas de bacalhau salgado seco, que foram embaladas com ar em vácuo. Nesta etapa as amostras foram armazenadas às temperaturas de: 4, 24, 27 e 30°C.

3.4 Etapa 3

Nesta etapa, após a receção das amostras (postas de bacalhau salgado seco), estas foram embaladas em EAM.

Na embalagem em EAM foi utilizada a combinação de 80% de azoto e 20% de dióxido de carbono (PRAXAIR Portugal S.A., Portugal).

Nesta fase as amostras foram armazenadas a quatro temperaturas diferentes, 4, 20, 27 e 30°C.

A composição gasosa dentro das embalagens foi medida através de um analisador de gases portátil [Witt-Gasetechnik, Oxybaby 6.0, Witten, Alemanha (Anexo III)].

3.5 Etapa 4

Para a realização da etapa 4 foram apenas utilizadas postas de bacalhau salgado seco. Antes do embalamento e armazenamento das postas estas foram imersas numa solução de metabissulfito de sódio (E223) a 2% durante 10 segundos. O excesso de solução foi escorrido colocando as postas sob papel absorvente. Após a aplicação do conservante, as postas de bacalhau foram divididas em dois grupos: um grupo onde as postas não foram sujeitas a secagem e um outro grupo que foi seco em secador de tabuleiros (Armfield, Reino Unido) durante 4 horas a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Anexo IV). Posteriormente, as postas foram embaladas em EAM (80% de azoto e 20% de dióxido de carbono) á temperatura de $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.6 Etapa 5

Na etapa final do estudo, as amostras de bacalhau salgado seco foram embaladas a vácuo, ar e em EAM, com e sem aplicação de E223 a três temperaturas de armazenagem diferentes (15, 25 e 35°C), seguindo os procedimentos descritos nas etapas anteriores (etapa 1, 2, 3 e 4 respectivamente). As amostras foram avaliadas microbiologicamente (secção 3.7) e sensorialmente (secção 3.8). A cor (secção 3.9) e pH (secção 3.10) das amostras foram também determinados.

Para as diferentes temperaturas de armazenamento foram realizadas diferentes amostragens de acordo com o seguinte desenho experimental:

Tabela 2. Desenho experimental utilizado na etapa 5 à temperatura de 35°C (a), 25°C (b) e de 15°C (c).

(a)		
Temperatura de armazenamento 35°C		
t	Dias de armazenamento	Amostras analisadas
t_0	1	Com e sem adição de E223.
t_1	7	Vácuo, com e sem adição de E223; EAM com e sem adição de E223; Ar, com e sem adição de E223,
t_2	14	Vácuo, com e sem adição de E223; EAM com e sem adição de E223; Ar, com e sem adição de E223.

(b)		
Temperatura de armazenamento 25°C		
t	Dias de armazenamento	Amostras analisadas
t_0	1	Com e sem adição de E223.
t_1	30	Vácuo, com e sem adição de E223; EAM com e sem adição de E223; Ar com e sem adição de E223.

(c)		
Temperatura de armazenamento 15°C		
t	Dias de armazenamento	Amostras analisadas
t_0	1	Com e sem adição de E223
t_1	30	Vácuo, com e sem adição de E223; Ar, com e sem adição de E223

3.7 Análise microbiológica

3.7.1 Enumeração de mesófilos halófilos aeróbios (com 16% de NaCl adicionado)

A enumeração de mesófilos halófilos aeróbios decorreu de acordo com a ISO 4833 (2003). Este procedimento de referencia descreve um método horizontal para enumeração de microrganismos capazes de crescer e formar colónias num meio sólido depois de incubação aeróbia a 30°C.

Para a enumeração de microrganismos mesófilos halófilos aeróbios nas amostras de bacalhau foram adicionados 225 g de triptona sal (Biokar, França) a 25 g de bacalhau. A suspensão obtida foi homogeneizada durante 60 s, obtendo-se a diluição decimal 10^{-1} . Foram preparadas as diluições seguintes até à diluição 10^{-6} .

Colocou-se numa placa de Petri esterilizada 1 ml da amostra, repetindo-se a operação, com as diluições seguintes. Adicionou-se ao inóculo cerca de 12-15 ml de Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Alemanha) fundido ($45^{\circ}\text{C}\pm 2$) com 16% de cloreto de sódio adicionado (NaCl, Merck, Darmstadt, Alemanha).

Incorporou-se cuidadosamente o inóculo com o meio realizando vários movimentos circulares de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. Deixou-se solidificar colocando as placas sobre uma superfície fria e horizontal. Incubaram-se as placas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $72\text{h} \pm 3\text{h}$ (Binder, Tuttlingen, Alemanha).

Após o período de incubação procedeu-se à contagem das placas, em cada placa de Petri de 2 diluições sucessivas que apresentassem entre 15 e no máximo 150 colónias.

Durante a realização das análises microbiológicas utilizou-se sempre material esterilizado [num autoclave (A.J.C, Cacém, Portugal) a 121°C durante 15 min.]. Executaram-se duplicados, bem como o controlo de esterilidade do meio utilizado.

3.7.2 Enumeração de mesófilos halófilos anaeróbios (com 16% de NaCl adicionado)

Para a enumeração de microrganismos mesófilos halófilos anaeróbios nas amostras de bacalhau, o procedimento foi idêntico ao descrito no ponto 3.7.1, no entanto, antes de proceder à incubação das placas estas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose (Merck, Alemanha). Dentro da jarra de anaerobiose foi colocada uma saqueta de Anaerocult®A (Merck, Alemanha). O Anaerocult®A é um reagente utilizado para gerar um meio anaeróbio. O sistema Anaerocult® é um sistema fiável para o cultivo de anaeróbios obrigatórios e facultativos. Este sistema baseia-se em saquetas feitas de papel altamente absorvente e permeável aos gases. As saquetas, de tamanhos diferentes, contêm uma mistura de reagentes que absorvem oxigénio e geram dióxido de carbono. A reação ativada pela adição de água, consiste na oxidação de ferro finamente dividido e na libertação de CO_2 . A reação é realizada sem um catalisador.

3.7.3 Enumeração de estafilococos coagulase positivos

Para a contagem de estafilococos nas amostras de bacalhau, foi seguida a técnica BRD 07/09-02/05 (2005), desenvolvida pela Bio-Rad. Esta técnica está otimizada para a deteção e enumeração de *Staphylococcus aureus*, e outros estafilococos coagulase positivos, em apenas 24 horas (± 2 h). O princípio do meio baseia-se na capacidade do *S. aureus* em reduzir o telurito (colónias pretas) e a sua capacidade e em provocar a proteólise da gema de ovo (halo claro em torno de colónias).

Para a enumeração dos estafilococos nas amostras de bacalhau, utilizou-se a suspensão anteriormente descrita nas secções 3.7.1 e 3.7.2. Esta suspensão foi homogeneizada durante 60 s, obtendo-se a diluição decimal 10^{-1} . Foram preparadas as diluições seguintes até à diluição 10^{-6} .

Examinou-se 0.5 ml da suspensão inicial distribuindo-a à superfície do meio RAPID'Staph agar (Bio-Rad, EUA) numa placa de 120 mm usando um espalhador. Deixaram-se as placas fechadas ± 15 min a temperatura ambiente para que o inóculo possa ser absorvido pelo meio. Repetiu-se a operação, com as diluições seguintes.

Incubaram-se as placas invertidas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ (Binder, Tuttlingen, Alemanha). Tendo o cuidado de não empilhar mais de 6 placas.

Após o período de incubação procedeu-se à contagem das colónias (1-2 mm) cinzas ou pretas (redução do telurito), convexas, rodeadas por um halo claro (2-5 mm, proteólise da gema de ovo). Confirmou-se utilizando três colónias obtidas em placas com 15 a 150 colónias. Para confirmar executou-se nas três colónias o teste PASTOREX Staph Plus (Bio-Rad, EUA).

Durante a realização das análises microbiológicas utilizou-se sempre material esterilizado [num autoclave (A.J.C, Cacém, Portugal) a 121°C durante 15 min.]. Executaram-se duplicados, bem como o controlo de esterilidade e o controlo negativo do meio utilizado.

3.7.4 Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores

A pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi realizada conforme a Norma Portuguesa NP 2262 (1986).

A NP 2262 (1986) aplica-se genericamente à pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores em géneros alimentícios e em alimentos para animais. Destina-se a estabelecer as regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores que

se entendem por ser formas de resistência das bactérias que originam colónias negras características devido à formação de sulfureto de ferro.

Para pesquisar a presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras de bacalhau foram adicionados 225 g de triptona sal (Biokar, França) a 25 g de bacalhau. A suspensão obtida foi homogeneizada durante 60 s, obtendo-se a diluição decimal 10^{-1} . Foram preparadas as diluições seguintes até à diluição 10^{-4} . Da suspensão-mãe (10^{-1}), retiraram-se amostras de 10 ml para dois tubos vazios estéreis. Retiraram-se também amostras de 1 ml da suspensão-mãe para dois tubos vazios estéreis. Da diluição 10^{-2} , retiraram-se amostras de 1 ml para dois tubos vazios. Procedeu-se do mesmo modo para as diluições seguintes. Para a inativação das células vegetativas e estimulação do aparecimento de esporos, os tubos foram introduzidos num banho a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 ± 1 min, após esse tempo efetuou-se o arrefecimento rápido dos tubos, colocando-os num banho com água fria. Introduziu-se assépticamente 10 ml de Sulfito-polimixina-sulfadiazina agar (SPS, Merck, Alemanha) de concentração dupla no tubo 10 ml de inóculo da solução-mãe. Introduziu-se asépticamente 10 ml de SPS (Merck, Alemanha) de concentração simples no tubo com 1 ml de inóculo da solução-mãe. Procedeu-se de forma semelhante para as diluições posteriores. Incubaram-se os tubos na estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 5 dias.

Os tubos que apresentaram colónias negras características, isoladas ou não, foram considerados positivos, uma vez que as colónias resultantes do desenvolvimento dos esporos têm tendência para alastrar e enegrecer todo o meio. Considerou-se a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores positiva nas diluições que apresentaram resultados positivos. Analogamente, considerou-se que não se detetou a presença de clostrídios sulfito-redutores nas diluições que apresentaram resultados negativos.

Durante a realização das análises microbiológicas utilizou-se sempre material esterilizado num autoclave (A.J.C, Cacém, Portugal) a 121°C durante 15 min. Executaram-se duplicados, bem como o controlo de esterilidade e o controlo negativo do meio utilizado.

3.8 Análise sensorial

3.8.1 Teste de aceitabilidade

Para a análise sensorial das amostras utilizou-se um método afetivo de aceitação nomeadamente o teste de aceitabilidade/preferência com escala hedónica (Anexo V) (ISO 8589, 2007).

As análises sensoriais foram realizadas a um grupo de 60 indivíduos de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 17 e os 50 anos.

A cada indivíduo foi entregue um conjunto de amostras codificadas e uma ficha com o teste de aceitabilidade composto por duas questões: avaliação individual de cada uma das amostras (tendo em conta a escala hedónica apresentada) e qual das amostras compraria.

As análises tiveram lugar no laboratório de análise sensorial da ESTM.

3.9 Determinação da cor

A medição da cor das amostras fez-se através da utilização de um colorímetro (Chroma Meter CR-400/410, KONIKA MINOLTA, Japão). Na avaliação dos parâmetros colorimétricos das amostras recorreu-se ao sistema CIELAB, tendo sido registados os valores de a^* , b^* e L^* para o cálculo do vetor de deslocação da cor recorrendo à seguinte equação:

$$\text{Vetor de deslocação da cor} = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2} \quad \text{eq. 1}$$

As leituras de cor foram realizadas com um ângulo de 90° à superfície das postas de bacalhau. Foram feitas nove leituras em cada amostra mudando a posição das postas.

Todas as amostras foram fotografadas (Olympus, modelo E-PL1, China). As fotografias foram realizadas no mesmo local (caixa com interior preto), à mesma distância (máquina-objeto) e à mesma intensidade luminosa de modo a uniformizar as condições de luz das fotografias.

3.10 Determinação do pH

Para a avaliação do pH do músculo de bacalhau seguiu-se o procedimento descrito por Rodrigues, (2006).

Na determinação do pH do músculo de bacalhau pesaram-se 5,0 g de músculo desfiado e homogeneizaram-se com 50 ml de água desionizada. O pH foi medido com recurso a um potenciómetro (Mettler, Metrohm, Suíça) previamente calibrado.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1

Preliminarmente pretendeu-se observar o aspecto visual de bacalhau salgado verde embalado a vácuo e com ar, armazenados a 24°C e a 30°C. Conforme a tabela 3, foi possível observar que em vácuo a ambas as temperaturas, as postas adquiriram rapidamente uma tonalidade mais escura. A exsudação das postas foi também bastante acentuada logo após uma semana de embalamento, em ambas as temperaturas estudadas. Ao fim de duas semanas, a deterioração do músculo foi bastante acentuada à temperatura de 30°C. Em vácuo, a alta temperatura provavelmente favoreceu o desenvolvimento de aeróbios facultativos e anaeróbios mesófilos que rapidamente degradaram o bacalhau.

Tabela 3. Estudo de dois tipos de embalagem (vácuo e ar) de bacalhau salgado seco a duas temperaturas (24 e 30°C)

Semana	Vácuo		Ar	
	24°C	30°C	24°C	30°C
1	Escurecimento Exsudação acentuada	Escurecimento Exsudação acentuada	Exsudação ligeira	Exsudação ligeira
2	Escurecimento Exsudação acentuada Pele desfaz-se ao toque	Escurecimento Exsudação acentuada Pele desfaz-se ao toque Amolecimento do músculo	Exsudação ligeira Vermelho – bactérias halófilicas	Escurecimento Exsudação ligeira Vermelho – bactérias halófilicas

No caso do bacalhau embalado com ar, foi possível observar uma ligeira exsudação em ambas as temperaturas de armazenamento. Ao fim de duas semanas de embalamento, e novamente em ambas as temperaturas, observou-se o aparecimento do *rouge*, ou “Vermelho”, mancha característica indicadora do surgimento de arqueobactérias halófilas (Rodrigues, 2006).

O bacalhau salgado (verde) não foi seco e, como tal, o seu teor de humidade ainda é elevado, favorecendo a degradação de natureza química e microbiológica. Embora não tenham sido realizadas análises, a degradação microbiológica foi facilmente observável no bacalhau verde embalado com ar.

Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente prosseguiram-se os estudos utilizando a embalagem em vácuo estudando-se, desta vez, quatro temperaturas diferentes e apenas bacalhau salgado seco.

4.2 Etapa 2

Considerando a rápida degradação do bacalhau verde, a partir da etapa 2 apenas se estudou bacalhau salgado seco. Nesta etapa pretendeu-se apreciar a estabilidade, em termos de aspecto geral, de postas de bacalhau salgado seco embaladas com ar e armazenadas a 4 temperaturas diferentes (4, 24, 27 e 30°C). Ao longo do armazenamento, as embalagens originaram a evolução gasosa apresentada na tabela 4.a). Como é possível observar na tabela 4.a), a concentração gasosa no *headspace* da embalagem alterou-se ao longo do tempo. De acordo com Goulas & Kontominas (2006), estas variações poderão ser resultado da interação da atmosfera com a posta bem como do desenvolvimento bacteriano ao longo do tempo. Estas variações devem-se também, muito provavelmente, à permeabilidade dos sacos utilizados, permitindo assim efetuar trocas gasosas com o exterior (Goulas & Kontominas, 2006; Provincial et al., 2010).

Tabela 4.a). Composição gasosa das embalagens de bacalhau salgado seco embalado a ar às temperaturas de 27 ±2, 4, 24, 30°C.

Semana	% O ₂				% CO ₂				% N ₂			
	T _{amb} (±27°C)	4°C	24°C	30°C	T _{amb} (±27°C)	4°C	24°C	30°C	T _{amb} (±27°C)	4°C	24°C	30°C
1	0,2	18,3	1,3	1,7	24,6	24,1	23,5	22,9	75,0	70,0	75,0	75,0
2	0,7	6,0	0,9	1,7	18,4	14,0	17,9	14,2	81,0	78,0	81,0	84,0
3	1,9	2,8	0,6	0,2	13,1	14,3	15,4	18,7	85,0	83,0	84,0	81,0
4	2,1	0,3	2,7	0,3	13,1	11,8	11,6	17,9	85,0	88,0	86,0	82,0

De acordo com Sivertsvik et al. (2004), a razão para a diminuição da concentração de CO₂ ao longo do tempo, poderá estar relacionada com a solubilização deste composto na fração líquida do músculo do bacalhau. Quanto à concentração de O₂, verifica-se uma diminuição nas embalagens a 4 e 30°C ao longo do tempo, provavelmente devido à atividade bacteriana, que consumiu algum oxigénio. Tal não se verificou nas embalagens à temperatura ambiente (27°C) e a 24°C, onde se registou um aumento de O₂ ao fim da 3ª e 4ª semana respetivamente. Infelizmente, devido à escassez de matéria-prima e à natureza preliminar indicativa do ensaio, não se realizaram réplicas, pelo que o aumento de O₂ observado a 24°C e a 27°C na 4ª semana poderá ser o resultado de um saco ou de uma selagem deficientes.

Visualmente, foi possível observar que, quanto menor é a temperatura de armazenamento melhor o aspeto geral das postas de bacalhau salgado seco (tabela 4.b). Contudo, mesmo a 4°C, ao fim de 2 semanas, o bacalhau já não apresenta o aspeto característico. Segundo a AIB (2010) o bacalhau salgado seco deve apresentar uma estrutura muscular consistente e

firme, pele íntegra e uma coloração característica uniforme, entre amarelo pálido e amarelo palha, o que não se verificou na etapa 2 apenas ao fim de duas semanas de embalagem em ar.

As indústrias desejam a manutenção da qualidade do seu produto o maior tempo possível e da forma mais económica possível. Em sequência, e a fim de reduzir custos no embalagem, o bacalhau salgado seco foi aqui embalado apenas com ar. Contudo, considerando o insucesso da manutenção da estabilidade do produto, considerou-se necessário proceder a ensaios preliminares relacionados com o embalagem de bacalhau salgado seco em vácuo e, principalmente em EAM, de forma a tentar prolongar o tempo de vida útil do produto.

Tabela 4. b). Avaliação visual do bacalhau salgado seco embalado com ar às temperaturas de 27 ±2, 4, 24, 30°C.

Semana	T _{amb} (27 ±2°C)	4°C	24°C	30°C
1	Aspeto Característico Alguma exsudação	Aspeto Característico	Aspeto Característico	Aspeto Característico Alguma exsudação
2	Exsudação	Aspeto Característico	Exsudação	Exsudação
3	Exsudação	Exsudação	Exsudação	Exsudação Amolecimento da carne
4	Exsudação Amolecimento da carne Vermelho – bactérias halofílicas	Exsudação	Exsudação	Exsudação Amolecimento da carne Vermelho – bactérias halofílicas

Após a etapa 2 procedeu-se à etapa 3 que se incidiu na alteração da atmosfera da embalagem ao longo de 3 semanas de armazenamento.

4.3 Etapa 3

Tendo em conta que o embalagem a vácuo de bacalhau salgado (verde) não apresentou vantagens na manutenção da estabilidade do produto (etapa1), foi realizado um estudo preliminar no qual se pretendeu observar a manutenção da estabilidade de postas de bacalhau salgado seco em EAM através da mistura gasosa 20 % CO₂: 80% N₂.

Ao longo do tempo de armazenamento ocorreram variações da atmosfera gasosa nas embalagens de bacalhau salgado seco, o que pode ser observado na tabela 5.a). Mais uma vez ocorreu uma diminuição da percentagem de CO₂ ao longo do tempo, e um aumento na percentagem de O₂.

Alguns consumidores foram convidados a comentar o aspeto geral das embalagens conservadas a 4°C, 24°C, 27°C e 30°C. Estes consideraram que as amostras armazenadas à temperatura mais baixa apresentavam um aspeto geral mais positivo (tabela 5.b).

A maior diferença do efeito da EAM reside no facto do músculo se manter íntegro, ao contrário do que se verificou nas postas embaladas com ar.

Tabela 5. a) Composição gasosa das embalagens de bacalhau salgado seco embalado em atmosfera modificada às temperaturas de 27 ±2, 4, 20, 30°C.

Semana	% O ₂				% CO ₂				% N ₂			
	T _{amb} (±27°C)	4°C	20°C	30°C	T _{amb} (±27°C)	4°C	20°C	30°C	T _{amb} (±27°C)	4°C	20°C	30°C
1	1,9	2,8	0,6	0,2	13,1	14,3	15,4	18,7	85,0	83,0	84,0	81,0
3	21,1	0,3	2,7	0,3	13,1	11,8	11,6	17,9	85,0	88,0	88,0	82,0

Tabela 5. b) Avaliação visual do bacalhau salgado seco embalado em atmosfera modificada às temperaturas de 27 ±2, 4, 20, 30°C.

Semana	T _{amb} (±27°C)	4°C	20°C	30°C
1	Aspeto característico Exsudação	Aspeto característico Exsudação	Aspeto característico	Escurecimento da posta Exsudação Pele desfaz-se ao toque Amolecimento da carne
3	Escurecimento da posta Exsudação Pele desfaz-se ao toque Vermelho - bactérias halofílicas	Escurecimento da posta Exsudação	Escurecimento da posta Exsudação	Escurecimento da posta Exsudação muito acentuada Pele desfaz-se ao toque

Com a análise dos resultados, é possível constatar que os maiores problemas, observados a qualquer temperatura (mesmo a 4°C) são a exsudação e o escurecimento das postas. Deste modo, de forma a tentar resolver esta situação, decidiu-se adicionar um conservante branqueador, o metabisulfito de sódio (E223).

Para tal foi necessário testar a melhor forma de aplicar o composto, na etapa 4.

4.4 Etapa 4

O E223 é usado como um aditivo alimentar, principalmente como conservante, funcionando essencialmente como um agente branqueador (Omar, 1998). Assim, as postas de bacalhau salgado seco foram imersas em solução 2% de conservante. Algumas postas foram secas a 25°C e outras não. Posteriormente, foram embaladas em EAM e armazenadas a 20°C. Ao longo do tempo foram registadas as variações da concentração gasosa (tabela 6.a). Mais uma vez observou-se uma diminuição da percentagem de CO₂. Após as 8 semanas de armazenamento verificou-se uma diminuição de 88% para o bacalhau sujeito a secagem e uma diminuição de 79% no bacalhau não sujeito a secagem.

Em contrapartida as percentagens de O₂ nas embalagens aumentaram cerca de 57% e 50% para o bacalhau sujeito a secagem e não seco, respetivamente. A percentagem de azoto sofreu também um aumento em ambos os grupos de bacalhau. Estas alterações nas percentagens dos gases das embalagens poderão dever-se à permeabilidade dos sacos utilizados para embalagem.

À semelhança da etapa 3, alguns apreciadores de bacalhau foram convidados a comentar o aspeto geral das embalagens e estes consideraram o bacalhau sujeito a secagem aquele que apresentava melhor aspeto, o que poderá indicar que a secagem do bacalhau após a adição do conservante é benéfico para a conservação do produto durante o tempo de armazenagem.

Tabela 6. a) Composição gasosa das embalagens de bacalhau salgado seco, com e sujeito ou não a secagem, e posteriormente armazenadas à temperatura de 20°C.

Semana	% O ₂		% CO ₂		% N ₂	
	Com Secagem	Sem secagem	Com Secagem	Sem secagem	Com Secagem	Sem secagem
1	3,4	3,1	21,0	20,5	76,0	76,0
2	2,4	2,2	14,5	14,5	83,0	83,0
3	2,7	2,5	13,8	11,0	83,0	86,0
5	----	----	----	----	----	----
8	7,9	6,2	2,5	4,3	90,0	89,0
Varição(%)	+ 56,96%	+50%	- 88,09%	- 79,02%	+ 15,55%	+ 14,60%

Tabela 6. b) Avaliação visual do bacalhau salgado seco com E223, sujeito ou não a secagem à temperatura de 25°C.

Semana	Com secagem a 25°C	Sem secagem a 25°C
1	Aspeto característico	Aspeto característico
2	Aspeto característico	Aspeto característico
3	Aspeto característico	Aspeto característico
5	Aspeto característico	Aspeto característico Vermelho - bactérias halofílicas
8	Aspeto característico Vermelho - bactérias halofílicas	Vermelho - bactérias halofílicas Exsudação ligeira Amolecimento da carne

Considerando os resultados obtidos na avaliação visual realizada pelos apreciadores de bacalhau, é necessário secar as postas de bacalhau a 25°C após a aplicação do E223 e antes do embalamento.

4.5 Etapa 5

Na etapa 5 foram estudadas combinações de vácuo com E223 e, por outro lado, EAM com e sem E223, a diferentes temperaturas (15, 25 e 35°C), a fim de encontrar a combinação temperatura/ embalagem que assegura, por mais tempo, a estabilidade do bacalhau salgado seco. A estabilidade foi avaliada através de análise sensorial, microbiológica, estudo das alterações de cor e de pH.

Como se pode observar na tabela 7, o teor dos gases no interior da embalagem alterou-se ao longo do tempo. Estas alterações resultaram provavelmente da interação entre as atmosferas modificadas com as postas de bacalhau, da atividade microbiana bem como com a permeabilidade da embalagem (Provincial et al., 2010).

Após 30 dias de armazenamento, o bacalhau embalado apenas com ar sofreu uma diminuição da percentagem de O₂ e um aumento da percentagem de CO₂ em todas as temperaturas de armazenamento. Após os 30 dias de armazenamento verificou-se uma diminuição de O₂ de 14% e 27% para as temperaturas de 15 e 25°C respectivamente. Tal facto, deve-se muito provavelmente à atividade microbiana (Goulas & Kontominas, 2006; Provincial et al., 2010). Por outro lado, as percentagens de CO₂ nas embalagens aumentaram cerca de 78%, e 73% para o bacalhau embalado apenas com ar às temperaturas de 15 e 25°C respectivamente. Ao fim de 14 dias de armazenamento a 35°C foi possível observar um decréscimo de 8% de O₂ e um aumento de cerca de 14% de CO₂. A percentagem de azoto sofreu também um aumento em todas as temperaturas de armazenamento. Estas alterações nas percentagens dos gases das embalagens poderão dever-se à permeabilidade dos sacos utilizados para embalagem.

Nas embalagens de EAM, verificou-se uma diminuição de 48% e 8% da percentagem de CO₂ após os 30 e 14 dias de armazenamento respetivamente. Uma vez que o CO₂ é um gás bastante solúvel, a diminuição da percentagem de CO₂ observada poderá ser devida à solubilidade deste na fração líquida do músculo (Sivertsvik et al., 2004). Por outro lado foi possível observar mais uma vez o aumento da percentagem de O₂, 58% e 13% respetivamente para as temperaturas de 25 e 35°C.

Nas embalagens de EAM com E223 verificaram-se resultados semelhantes ao das EAM sem a adição de E223, isto é, verifica-se um aumento da percentagem de O₂ (69% e 15%) e uma diminuição da percentagem de CO₂ (51% e 13%).

Tabela 7. Composição gasosa das diferentes embalagens armazenadas a 15, 25 e 35°C. Os valores correspondem à média ± desvio padrão *n*=3.

Temperatura de Armazenamento	Dias de Armazenamento	Ar			EAM			EAM+E223		
		%O ₂	%N ₂	%CO ₂	%O ₂	%N ₂	%CO ₂	%O ₂	%N ₂	%CO ₂
15°C	1	20,8 ± 0,1	79,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1	—	—	—	—	—	—
	30	17,9 ± 2,1	80,0 ± 0,0	2,3 ± 1,7	—	—	—	—	—	—
Varição (%)		-13.94%	1.25%	78.26%	—	—	—	—	—	—
25°C	1	20,3 ± 0,1	79,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	81,0 ± 0,0	17,1 ± 0,1	1,5 ± 0,3	81,3 ± 0,6	17,1 ± 0,4
	30	14,8 ± 2,2	81,5 ± 0,5	3,4 ± 1,7	3,8 ± 0,1	87,5 ± 0,5	8,9 ± 0,2	4,8 ± 0,4	87 ± 0,0	8,3 ± 0,3
Varição (%)		-27.09%	3.067%	73.53%	57.89%	7.43%	-47.95%	68.75%	6.55%	-51.46%
35°C	1	19,9 ± 0,1	79,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	3,2 ± 0,6	83,3 ± 0,6	12,5 ± 1,0	2,3 ± 0,1	82,0 ± 0,0	15,7 ± 0,1
	7	18,5 ± 1,3	79,8 ± 0,8	1,2 ± 0,2	3,5 ± 0,8	83,3 ± 0,5	12,3 ± 0,6	2,5 ± 0,2	83,5 ± 0,5	14,8 ± 0,1
	14	18,3 ± 1,1	80,3 ± 1,5	1,4 ± 0,3	3,7 ± 0,9	83,8 ± 0,8	11,4 ± 0,5	2,7 ± 0,2	84,0 ± 0,0	13,7 ± 0,2
Varição (%)		-8.04 %	1.62%	14.29 %	13.51 %	0.60%	-8.80%	14.81 %	2.38%	-12.74%

Quanto às alterações de cor das amostras, ao longo do tempo de armazenamento, observa-se, uma alteração da cor em todos os tipos de embalagem em relação à cor inicial do bacalhau salgado seco. Ao observar as figuras 3 a 8 é ainda possível verificar que em temperaturas de armazenamento mais altas (25 e 35°C) esta variação surge mais cedo (ao fim de 15 dias) e com valores mais elevados.

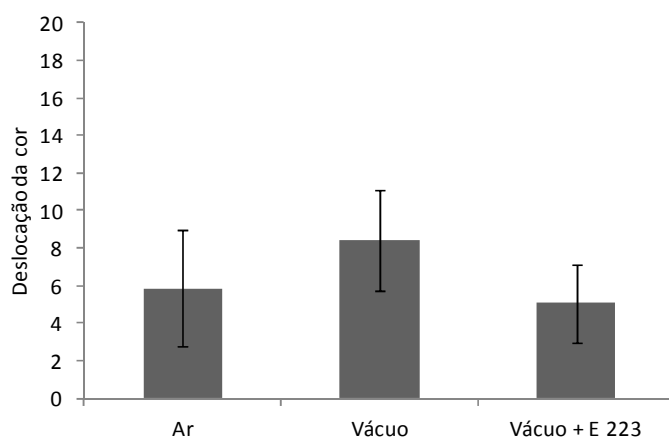


Figura 3. Vetor de deslocação da cor nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 15°C. Os valores correspondem à média ± desvio padrão $n=3$.

Na figura 4 podem-se observar as alterações visuais que o bacalhau salgado seco sofreu ao longo do tempo. Consegue-se perceber que ao t_2 em todos os casos houve um escurecimento da posta, sendo que no caso da embalagem a vácuo, este é mais acentuado. A embalagem com ar foi a que visualmente apresentou uma posta mais estável. Pode-se ainda observar o exsudado que se vai formando ao longo do tempo, sendo que é mais acentuado apenas às 3 semanas de armazenamento (t_2).

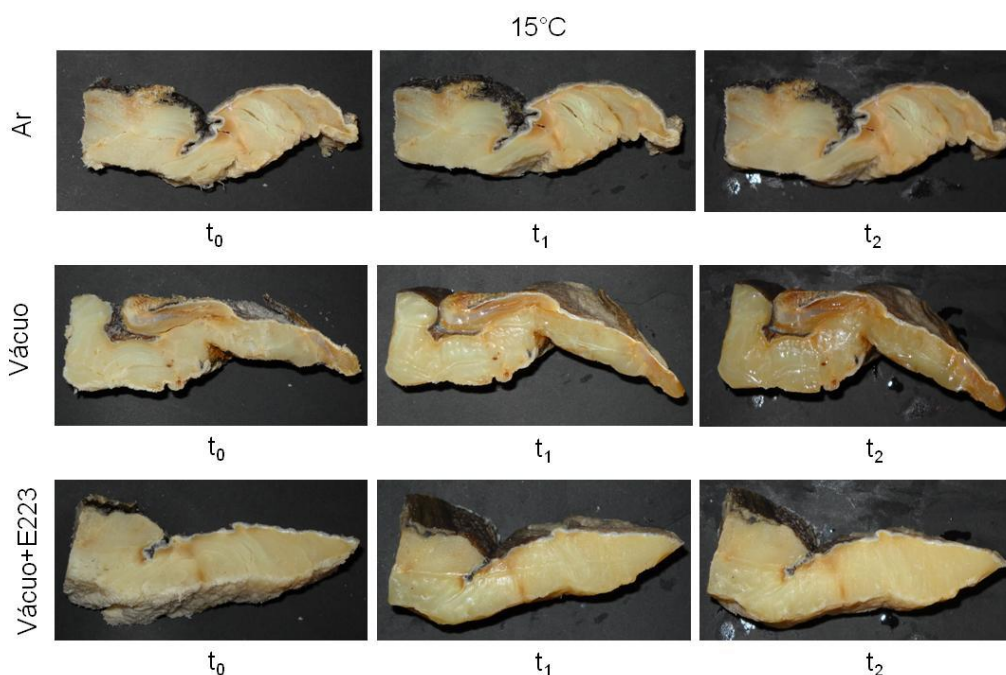


Figura 4. Alterações/Evolução visual do bacalhau salgado seco durante os 30 dias (t_0 : 1 dia, t_1 :15 dias e t_2 : 30 dias) armazenado a 15°C.

À temperatura de armazenagem de 25°C pode-se observar (figura 5) que a embalagem a vácuo com a aplicação do conservante E223 foi a que apresentou uma maior deslocação da cor. Tal não era esperado visto que o objetivo principal da aplicação do conservante era o branqueamento do produto graças às suas propriedades branqueadoras e não o escurecimento do produto.

Na figura 6 pode-se observar as alterações visuais que o bacalhau sofre ao longo do tempo de armazenamento. Consegue-se perceber que ao t_1 começa a notar-se um escurecimento da posta, sendo que no caso da embalagem a vácuo é mais acentuado.

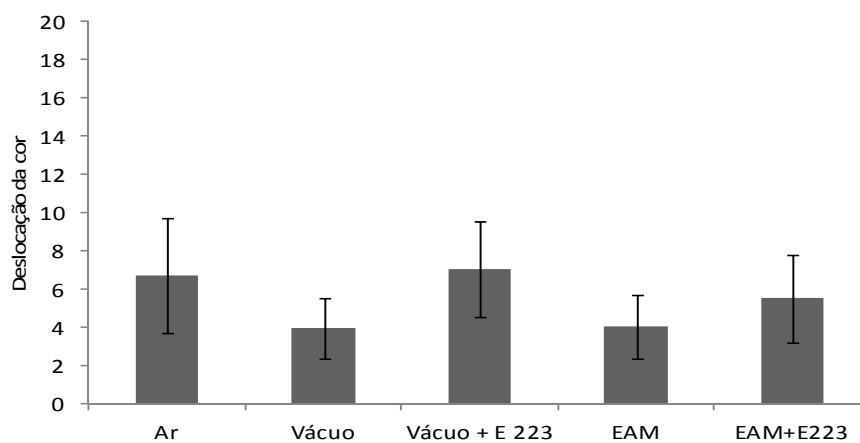


Figura 5. Vetor de deslocação da cor nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 25°C. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão $n=3$.

A EAM foi a que visualmente apresentou uma posta mais estável, ou seja com menos alterações visuais. Pode-se ainda observar o exsudado que se forma durante o armazenamento, e que é mais acentuado apenas no t_2 (3 semanas de armazenamento).

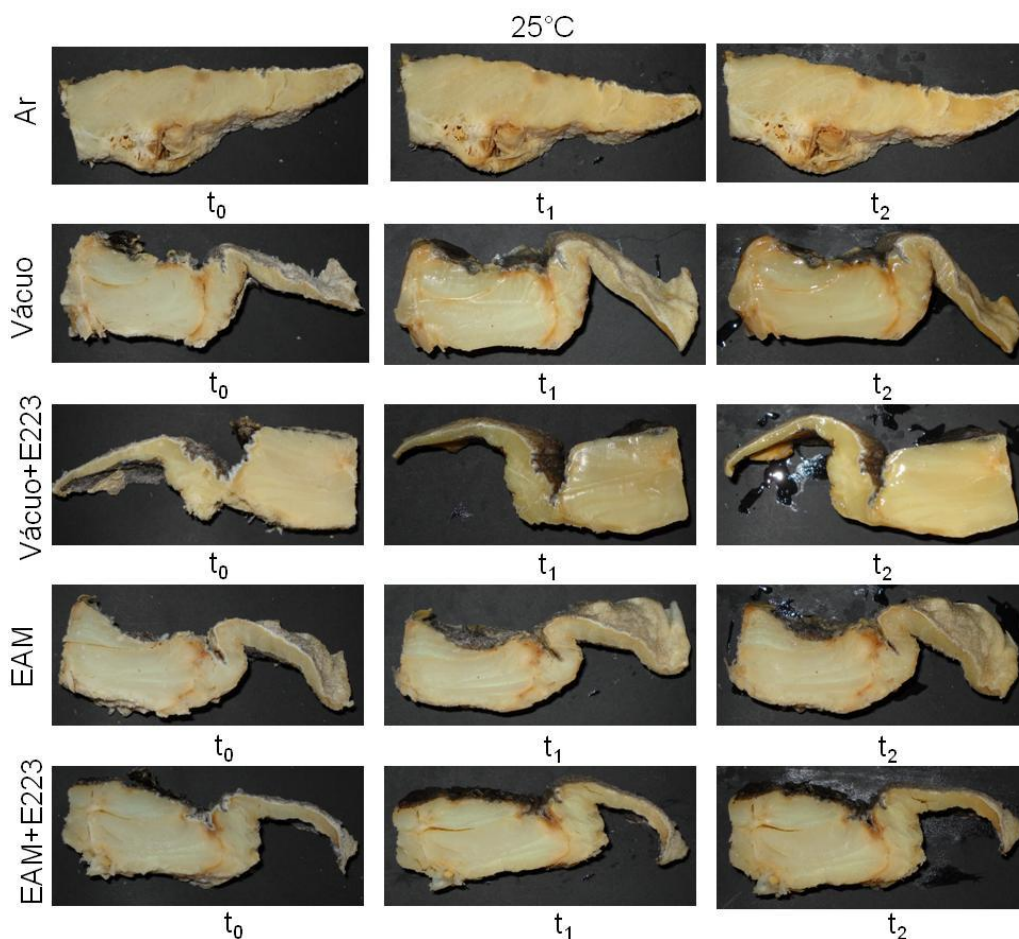


Figura 6. Alterações/Evolução visual do bacalhau salgado seco durante os 30 dias (t_0 : 1 dia, t_1 : 15 dias e t_2 : 30 dias) armazenado a 25°C.

Relativamente ao armazenamento das embalagens à temperatura de 35°C, a EAM (figura 7) foi a que apresentou uma maior deslocação da cor (14.81).

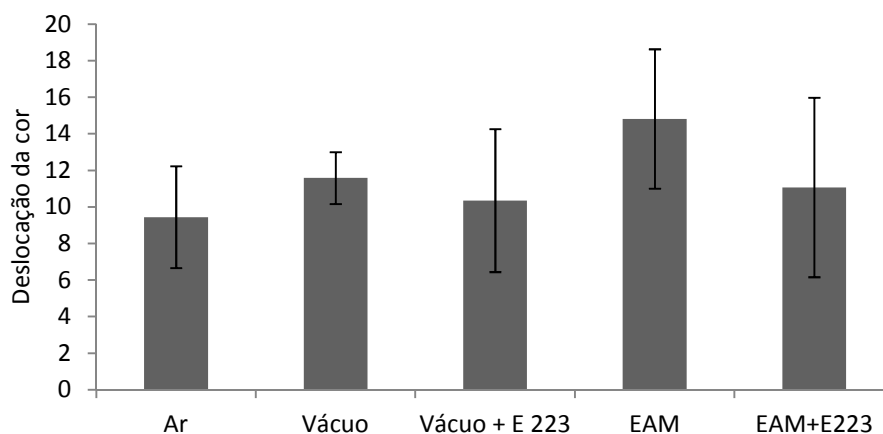


Figura 7. Vetor de deslocação da cor nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 35°C. Os valores correspondem à média ± desvio padrão $n=3$

Na figura 8 podem-se observar as alterações visuais do bacalhau ao longo das 3 semanas de armazenamento. Ao t_1 denota-se um escurecimento da posta, sendo que no caso da embalagem a vácuo este é mais acentuado. Quanto à EAM, esta foi a embalagem que visualmente apresentou uma posta com menores alterações até ao final do armazenamento.

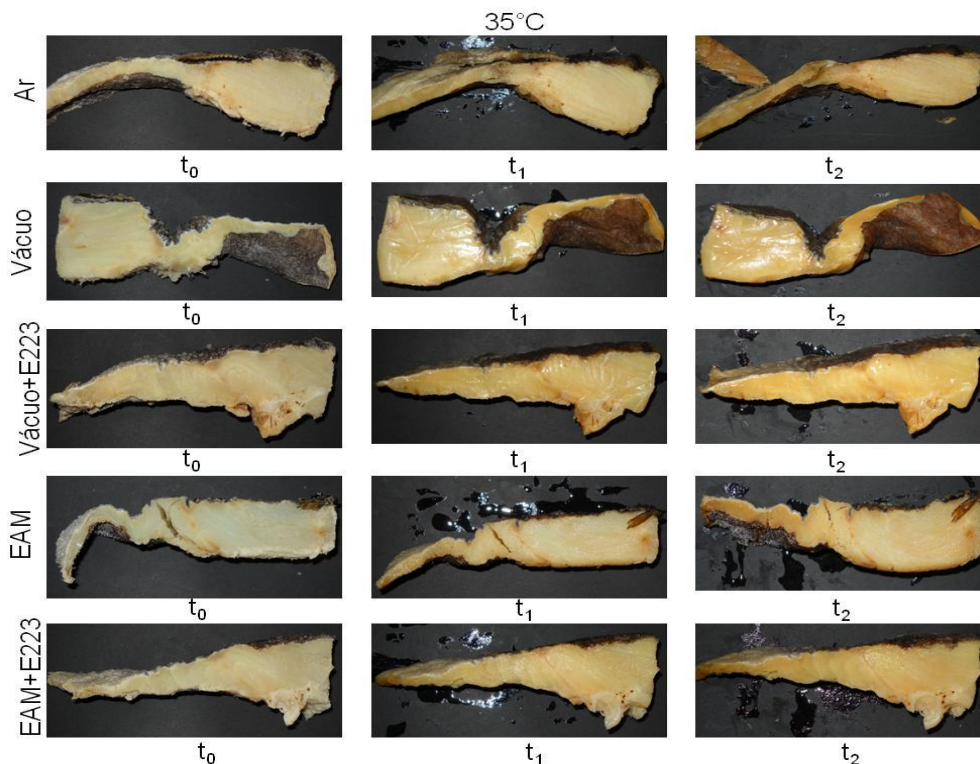


Figura 8. Alterações/Evolução visual do bacalhau salgado seco durante os 30 dias (t_0 : 1 dia, t_1 : 15 dias e t_2 : 30 dias) armazenado a 35°C.

É também visível o exsudado que se vai formando ao longo do tempo, e que se torna mais visível após as 3 semanas de armazenamento (t_2).

O valor de pH foi considerado por Lauritzen et al. (2004) como um importante parâmetro na qualidade de bacalhau salgado seco. Neste estudo, os valores de pH das amostras variavam entre 5,38 a 7,38. Aas et al. (2010) mostraram que o pH medido em amostras de bacalhau armazenadas a 4°C e posteriormente expostas a temperaturas de 20°C variou entre 5,8 e 6,1 durante todo o período de armazenamento (24 meses).

No presente estudo, o pH inicial do bacalhau (T_0) foi de $6,03 \pm 0,03$. Nas figuras 9 a 11 encontram-se representadas as diferenças de pH que se registaram em todos os tipos de embalagem ao longo do tempo de armazenamento. Não foram registadas muitas alterações nos valores de pH das amostras, registando-se apenas uma variação máxima de $0,60 \pm 0,01$ no caso do bacalhau embalado em EAM+E223 (figura 11) a 35°C e uma variação mínima de $0,19 \pm 0,02$ no caso do bacalhau embalado em EAM (figura 10) a 25°C.

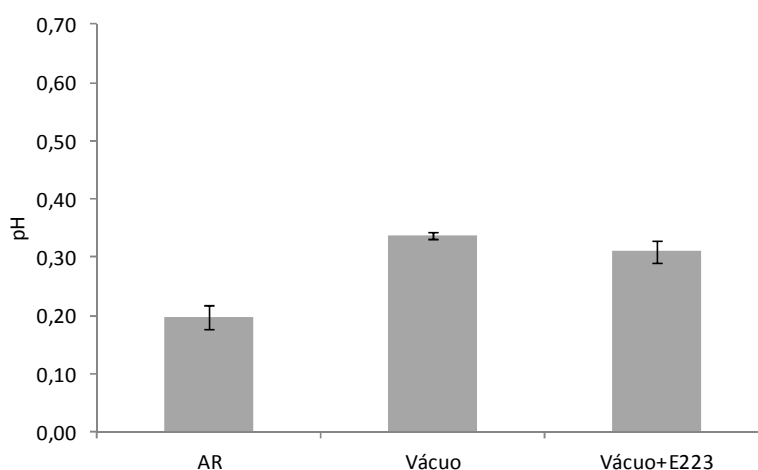


Figura 9. Desvio de pH nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 15°C. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão ($n=3$).

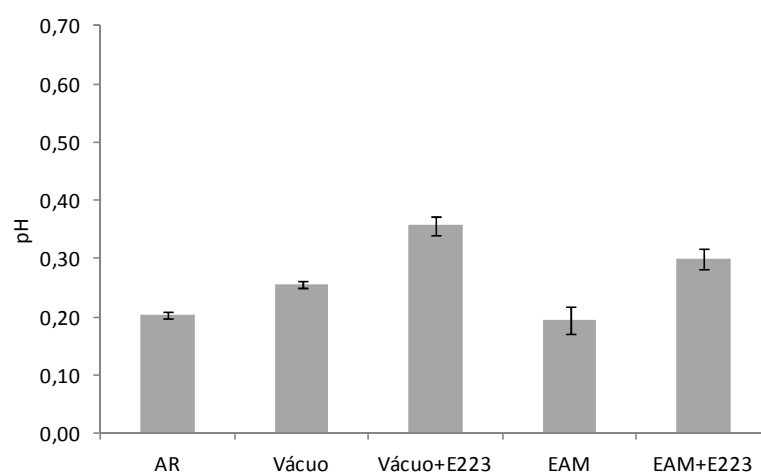


Figura 10. Desvio de pH nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 25°C. Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3).

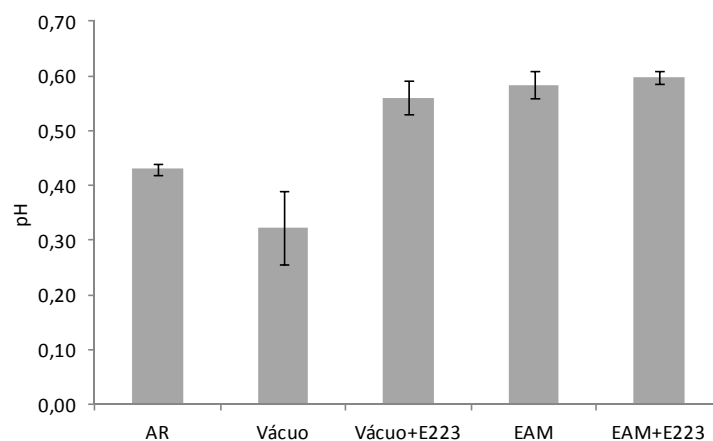


Figura 11. Desvio de pH nos diferentes tipos de embalagens armazenadas a 35°C. Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3).

Quanto à avaliação microbiológica do bacalhau salgado seco embalado nas diferentes condições, a evolução de estafilococos coagulase positiva, bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias bem como os esporos de clostrídios sulfito-redutores está representada nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Contagem de estafilococos coagulase positiva, aeróbios e anaeróbios totais e esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras armazenadas a 15°C ao longo do tempo (T₀:1 dia; T₁:30 dias).

	T0		T1		
	Sem E223	Com E223	Ar	Vácuo	Vácuo+E223
Estafilococos coagulase positiva (Log UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10
Aeróbios totais (Log UFC/g)	4,45	6,11	4,28	<10	<10
Anaeróbios totais (Log UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10
Esporos de clostridio sulfito-redutores (presença ou ausência/10 g)	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente

Tabela 9. Contagem de estafilococos coagulase positiva, aeróbios e anaeróbios totais e esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras armazenadas a 25°C ao longo do tempo (T₀:1 dia; T₁:30 dias).

	T0		T1				
	Sem E223	Com E223	Ar	Vácuo	Vácuo+E223	EAM	EAM+E223
Estafilococos coagulase positiva (Log UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Aeróbios totais (Log UFC/g)	5,48	3,04	5,3	5,11	4,52	4,77	4,67
Anaeróbios totais (Log UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Esporos de clostridio sulfito-redutores (presença ou ausência/10 g)	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente

Tabela 10. Contagem de estafilococos coagulase positiva, aeróbios e anaeróbios totais e esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras armazenadas a 35°C ao longo do tempo (T₀:1 dia; T₁:7 dias; T₂:15 dias).

	T0		T1					T2				
	Sem E223	Com E223	Ar	Vácuo	Vácuo+E223	EAM	EAM+E223	Ar	Vácuo	Vácuo+E223	EAM	EAM+E223
Estafilococos coagulase positiva (Log UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Aeróbios totais (Log UFC/g)	4,60	4,43	5,90	5,34	4,15	5,23	4,34	<10	4,11	3,88	3,65	4,41
Anaeróbios totais (Log UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	3,00	2,26	<10	3,89
Esporos de clostridio sulfito-redutores (presença ou ausência/10 g)	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente

Surpreendentemente, não se detetaram estafilococos coagulase positivos, contudo, o número de aeróbios totais nas amostras de bacalhau salgado seco é elevado. Microbiologicamente o bacalhau mantém a estabilidade já que o número de microrganismos não aumenta ao longo do tempo. Assim, estes parâmetros não serão os adequados como indicadores da degradação de bacalhau salgado seco.

Os halófilos anaeróbios mesófilos ocorrem no produto após os 15 dias (t1) de armazenamento, tal como após 30 dias de armazenamento, no entanto, em número inferior aos aeróbios. Apesar das condições anaeróbias, o produto não apresenta clostrídios sulfito redutores.

No que respeita ao estudo sensorial dos vários produtos, foi pedido aos inquiridos que avaliassem globalmente cada uma das embalagens apresentadas (indicar os parâmetros: cor, aspecto, textura). As respostas aos inquéritos realizados encontram-se representadas nas figuras 12, 13 e 14.

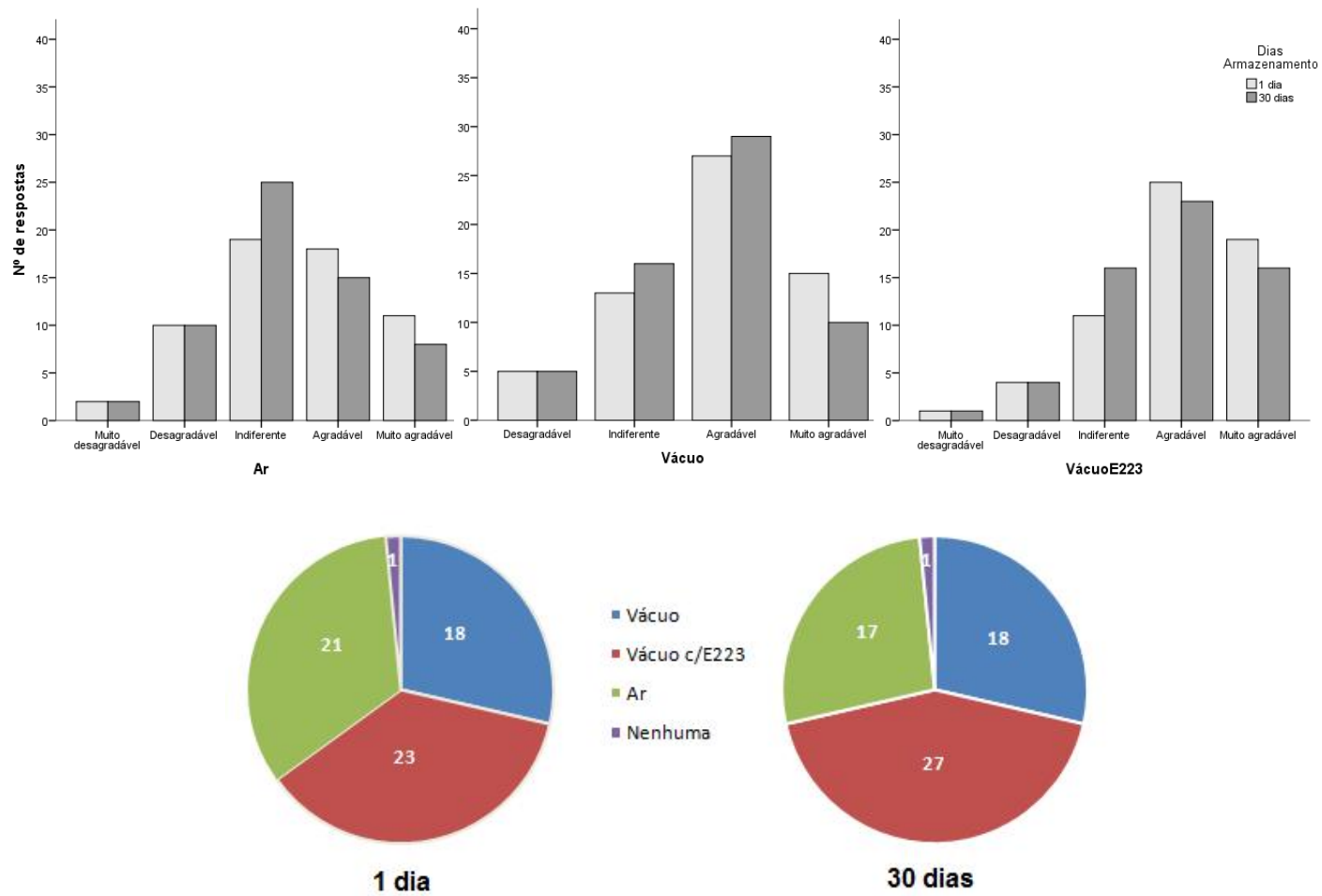


Figura 12. Respostas aos inquéritos realizados referentes à temperatura de armazenagem de 15°C. O gráfico de barras indica a avaliação global de cada uma das amostras e o gráfico circular indica a preferência de compra.

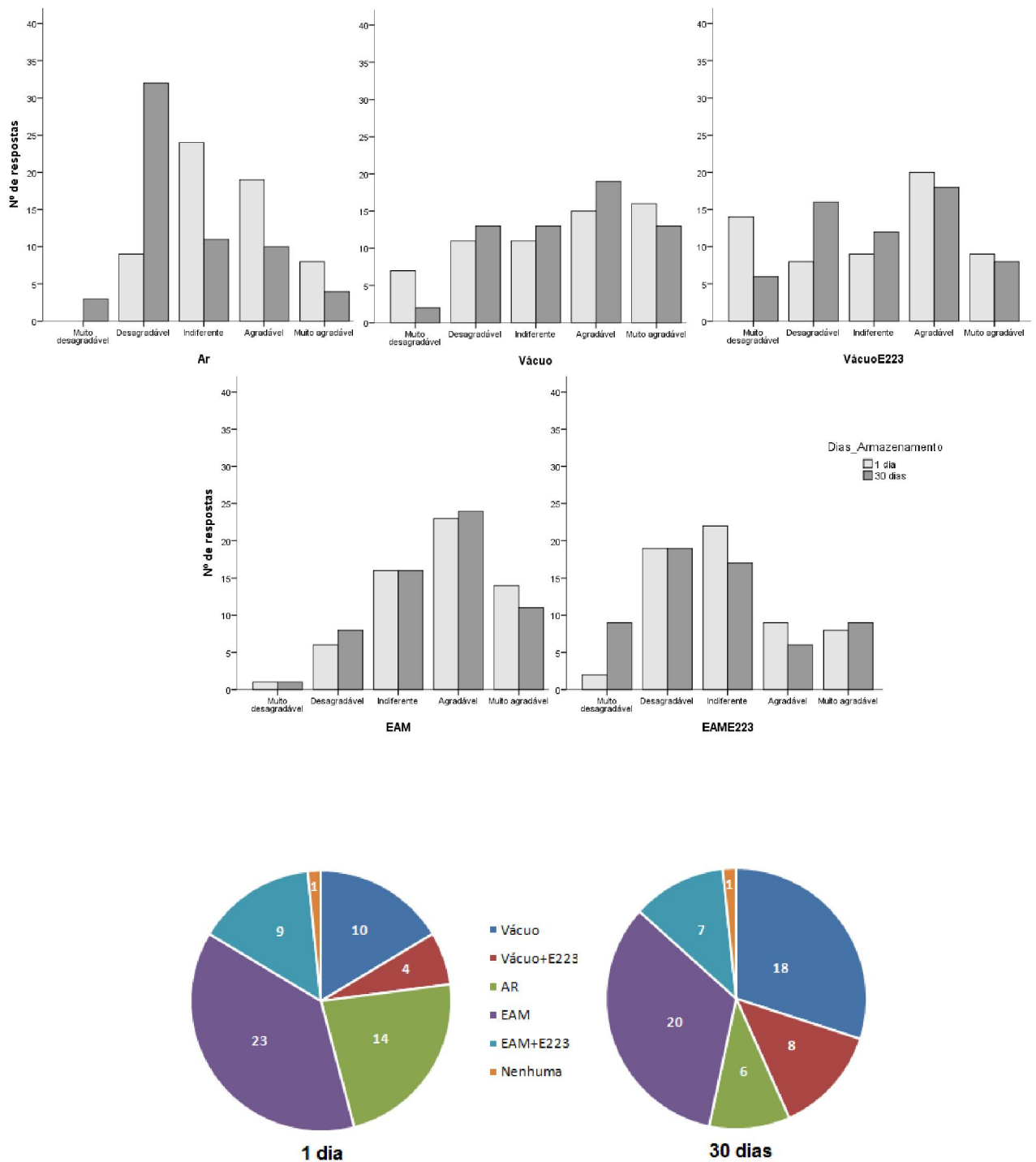


Figura 13. Respostas aos inquéritos realizados referentes à temperatura de armazenagem de 25°C. O gráfico de barras indica a avaliação global de cada uma das amostras e o gráfico circular indica a preferência de compra.

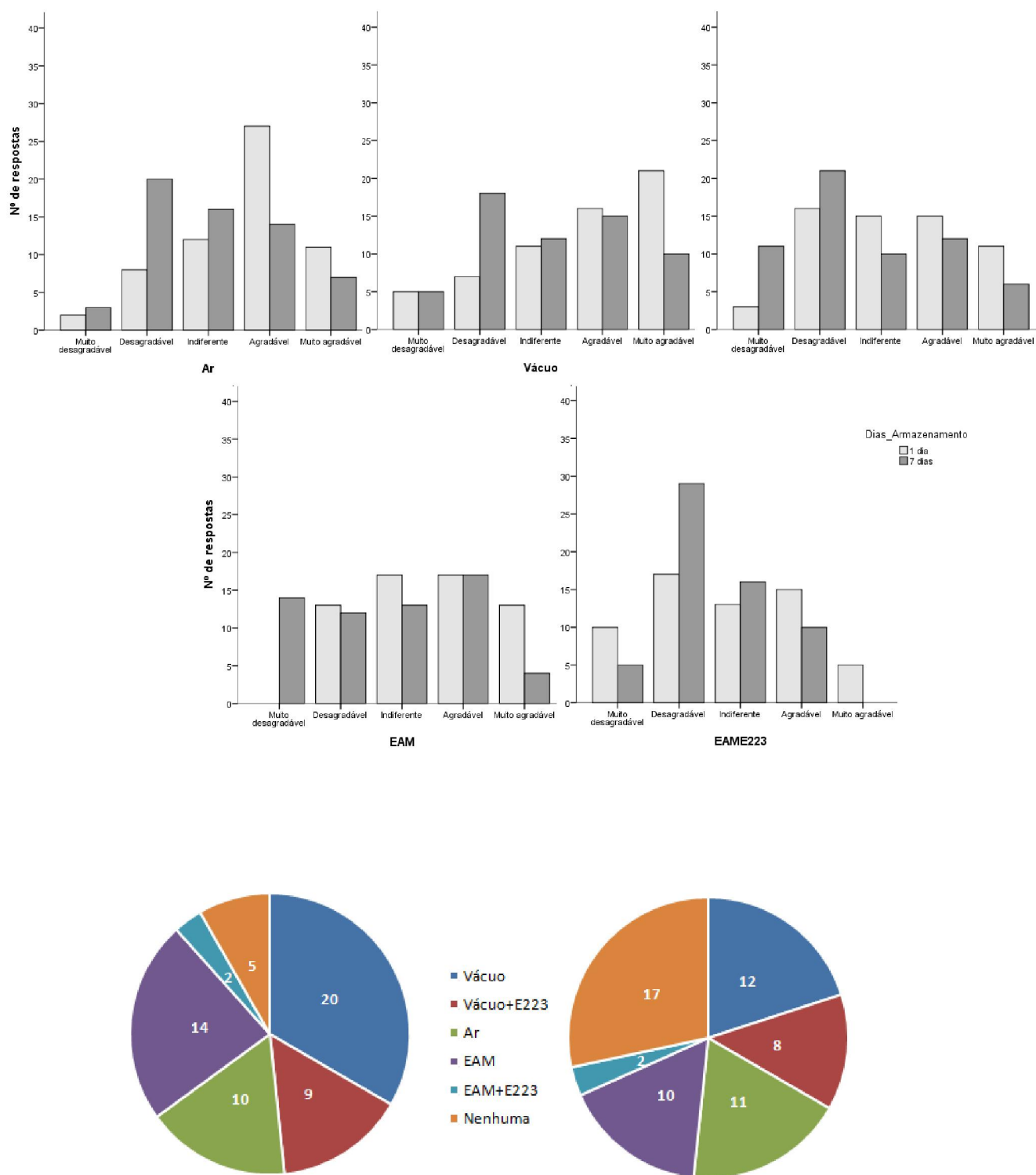


Figura 14. Respostas aos inquéritos realizados referentes à temperatura de armazenagem de 35°C. O gráfico de barras indica a avaliação global de cada uma das amostras e o gráfico circular indica a preferência de compra.

Ao fim de 30 dias de armazenamento a 15°C (figura 12) o bacalhau salgado seco ainda é considerado pela maioria dos inquiridos como “muito agradável”, “agradável” e “indiferente”. O número de avaliadores que considerou “muito agradável” e “agradável” foi superior nas 3 formas de embalagem estudadas. O produto ao fim de 30 dias à temperatura de 15°C ainda não se encontrava degradado a nível sensorial. Adicionalmente é importante referir que, foi notória, a preferência dos avaliadores pelo bacalhau embalado a vácuo com a adição do conservante E223. Este resultado poderá coincidir com a preferência de compra de bacalhau salgado seco com um aspeto mais branco, por parte do consumidor.

Quanto ao bacalhau conservado a 25°C (figura 13), ao fim de 30 dias, a preferência dos avaliadores recai sobre a EAM (sem adição de E223). Ou seja, a 25°C o E223 não aparenta introduzir melhorias na conservação do produto. A mesma tendência foi obtida na preferência de compra. Por outro lado, comparando a embalagem a vácuo com EAM, esta última foi classificada, com frequência, como “agradável” e “muito agradável”. Quanto ao teste sobre a preferência de compra, a conservação por EAM e vácuo apresenta resultados muito próximos (figura 13). A embalagem com ar originou uma pontuação superior nas classificações “muito desagradável” e “desagradável”, por comparação com todas as outras formas de embalagem. Na embalagem a ar, o bacalhau apresentava bastante exsudado dentro da embalagem bem como uma coloração bastante escura. Era notório também o amolecimento da posta que se desagregava com facilidade ao toque.

Ao fim de 7 dias a 35°C (figura 14), a maioria dos avaliadores não classifica as postas embaladas em ar, vácuo e EAM (com e sem adição de E223), como “agradável” e “muito agradável”. A classificação mais frequente foi “indiferente”, “desagradável” e “muito desagradável”, mesmo nas amostras embaladas com E223. À semelhança dos resultados obtidos a 25°C, o E223 não promoveu a estabilidade do produto. Para além do referido, ao 7º dia, 28% (17/60) dos inquiridos não compraria nenhuma das embalagens estudadas. Como tal, ao fim de 7 dias a 35°C, independentemente da forma de embalagem, as postas de bacalhau salgado encontravam-se degradadas não se tornando apelativas para o consumidor.



5. CONCLUSÃO

O presente trabalho comprova que o embalamento de bacalhau salgado a vácuo e EAM pode incrementar o tempo de vida útil de prateleira (por comparação com o embalamento a ar) do bacalhau salgado seco. A temperatura de armazenamento é um fator muito importante uma vez que a menores temperaturas de armazenamento, o bacalhau apresenta um aspeto mais favorável, e maior é o período de conservação, independentemente do tipo de embalamento do produto.

O E223 beneficia o produto armazenado a temperaturas mais baixas mas não aparenta introduzir melhorias no bacalhau conservado a temperaturas acima de 25°C. Em condições de abuso de temperatura (15, 25 e 35°C), a preferência dos consumidores recai sobre a EAM (80%N₂:20%CO₂).



6. PERSPETIVAS FUTURAS

A atmosfera modificada prolonga a vida comercial do produto, mantém a frescura dos alimentos e as suas características de sabor, textura e odor, reduz os custos de armazenamento, evita a mistura de odores e melhora a salubridade do produto durante o armazenamento. Assim, seria importante continuar o presente estudo já que os resultados do EAM de bacalhau salgado seco são promissores.

No presente estudo apenas foi possível observar a estabilidade do produto, durante um mês, pelo que é extremamente importante dar continuidade ao estudo de forma a perceber as alterações que poderão ocorrer ao longo do tempo, utilizando outros parâmetros microbiológicos (estudar diferentes concentrações de NaCl adicionado ao meio), químicos (azoto básico volátil total (ABVT), trimetilamina (TMA), humidade, teor de sal) e físicos (textura, *drip loss*) com os quais seja possível estabelecer uma correlação com a evolução sensorial.

Considerando que os parâmetros microbiológicos se mantiveram estáveis, estando o produto sensorialmente degradado, a avaliação sensorial é fundamental para o estudo da estabilidade do bacalhau salgado seco. Pelo que se sugere a elaboração de tabelas mais completas quer para avaliação das alterações em cru, quer depois de demolido e cozinhado.

Por último, é de referir que ensaios com outras atmosferas e com outros materiais de embalagem são necessários.



7. BIBLIOGRAFIA

- Aas, G. H., Skjerdal, O. T., Stoknes, I., Bjrkevoll, I. (2010). Effects of Packaging Method on Salt-Cured Cod Yield and Quality During Storage, *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 19, 149-161;
- AIB, 2010. Caderno de especificações e obrigações do produto - bacalhau de cura tradicional portuguesa. Versão remetida para análise na CE. (Fevereiro) Associação dos Industriais do Bacalhau.
- Arvanitoyannis, I. (2012). Modified Atmosphere and Active Packaging Technologies, CRC press, EUA
- Bastos, J.R. (1988). Manual Sobre Manejo de Reservatórios Para a Produção de Peixes. Documento de Campo 9. Projeto GCP/RLA/075/ITA Programa Cooperativo Governamental.
- Berkel, B. (2005). Conservação de peixe e carne. Marja de Goffau-Markusse. Fundação Agromisa, Wageningen, Alemanha..
- BRD-07/9-02/05 (2005). Validation certificate for alternative analytical method according to standard EN ISO 16140:2003. AFAQ AFNOR Certification. Bagneux. France.
- Coles, R., Kirwan, M. (2011). Food and Beverage Packaging Technology. 2ª ed., Blackwell Publishing Ltd. Reino Unido,
- Chukwu, O., Shaba, I. (2009). Effects of Drying Methods on Proximate Compositions of Catfish (*Clarias gariepinus*). *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(1), 114–116.
- DL (2005). Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de Janeiro. Determinação do Teor de Cloretos em Bacalhau e Espécies Afins Salgadas, Verdes, Semi-secas ou Secas. DR N.º 20, I Série A: 696-703.
- Dias, S.M.P. (2013). Processo de Cura Amarela do Bacalhau: Dinâmica de Populações Microbianas, Indicadores Químicos e Descritores Sensoriais. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa
- FAO (1990). Gadiform Fishes of the world (Order Gadiformes). An Annotated and Illustrated Catalogue of Cods, Hakes, Grenadiers and other Gadiform Fishes Known to Date. FAO Fisheries Synopsis. No. 125, Vol.10. Rome, FAO.
- Goulas, A.E., Kontominas, M.G. (2006). Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on the shelf-life of refrigerated chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *European Food Research Technology*, 224, 545–553.

-
- Horne, J. (2001). Some Notes of Fish Handling and Processing. Torry Advisory Department of Trade and Industry. Torry Research Station. Note nº 50 – FAO Corporate Document Repository.
 - Huss (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper, Nº 348, Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Rome (Acedido através FAO em <http://www.fao.org/docrep/v7180e/V7180E00.HTM#Contents>,. 05-09-2014).
 - INE (2013). Estatísticas da Pesca. Instituto Nacional de Estatística, I.P., Lisboa,
 - ISO 8402 (1994). Quality management and quality assurance. International Standard Organization, Zurich, Switzerland
 - ISO 4833 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of microorganisms- Colony-count technique at 30°C. International Standard Organization, Zurich. Zurich, Switzerland
 - ISO 8589 (2007). Sensory analysis- General guidance for the design of test rooms. International Standard Organization, Zurich. Zurich, Switzerland
 - Kilic, A. (2009). Low temperature and high velocity (LTHV) application in drying: Characteristics and effects on the fish quality. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 173–182.
 - Kituu, G., Shitanda, D., Kanali, C., Mailutha, J., Njoroge, C., Wainaina, J., Silayo, V. (2010). Thin layer drying model for simulating the drying of Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) in a solar tunnel dryer. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 325–331.
 - Lauritzen, K. (2004). Quality of salted cod ax influenced by raw material and salt composition. PhD Thesis. Norwegian College of Fishery Science University of Tromso. Norway.
 - Mol, S., Cosansu, S., Ucok, D., Ozturan, S. (2010). Survival of *Salmonella enteritidis* during salting and drying of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), 36–40.
 - Nguyen, M.V. (2007). The effects of storing and drying on the quality of cured, salted cod. Final Project, UNU-Fisheries Training Program, Reikiavik, Iceland
 - Nunes, M.L., Batista, I., Cardoso, C. (2007). Aplicação do Índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado, Publicações avulsas do IPIMAR, Lisboa.
 - NP 2262 (1986). Microbiologia alimentar. Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito -redutores. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.

-
- Oehlenschläger, J., Rehbein, H. (2009). Basic facts and figures. In: Fishery products: quality, safety and authenticity. Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 1-18.
 - Omar, M.I.V. (1998). Utilization of sodium metabisulphite for preservation of frozen-thawed shrimp (*Pandalus borealis*). Final Project, UNU-Fisheries Training Program, Reikiavik, Iceland.
 - Ortiz, J., Lemus-Monzdaca, R., Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Puente-Díaz, L., Zura-Bravo, L., Aubourg, S. (2013). Influence of air-drying temperature on drying kinetics, colour, firmness and biochemical characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fillets. *Food chemistry*, 139(1-4), 162–9.
 - Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y. (2003). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*), *Food Chemistry*, 85, 49–57.
 - Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J.J., Cabo, M.L. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life of iced fresh hake slices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 541–547.
 - Phillips, C.A. (1996). A Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 463–479.
 - Provincial, L., Gil, M., Guillén, E., Alonso, V., Roncalés, P., Beltrán, J.A. (2010). Effect of modified atmosphere packaging using different CO₂ and N₂ combinations on physical, chemical, microbiological and sensory changes of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1828–1836.
 - Rodrigues, M.J. (2006). Estudos de qualidade em bacalhau. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
 - Rotabakk, B.T., Sivertsvik, M., Birkeland, S. (2009). Microbiological Quality of Desalted Cod in Consumer Packages—Effects of Storage Atmospheres and Pretreatments, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18:1-2, 18-31.
 - Salvador, Â.M.C. (2009). Efeito de alta pressão no processo de demolha de bacalhau. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro, Departamento de Química. Aveiro
 - Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial

growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 107-127.

- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T. (2004). Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: raw fish fillets. *Journal of Food Engineering*, 63,451-458.
- Thórarinsdóttir, K.A., Bjørkevoll, I., Arason, S. (2010). Production of salted fish in the Nordic countries. Variation in quality and characteristics of the salted products. Skýrsla Matís, Reikiavik, Iceland.
- Venugopal, V., Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12:2, 175-197.
- Zeuthen, P., Bøgh-Sørensen, L. (2003). Food preservation techniques. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
- Zeng, D., Mai, K., Ai, Q., Milley, J., Lall, S. (2010). Lipid and fatty acid compositions of cod (*Gadus morhua*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Ocean University of China*, 9(4), 381–388.

8. ANEXOS

ANEXO I – Embaladora a vácuo utilizada para a realização dos ensaios com embalagens em vácuo, ar e atmosfera modificada;

ANEXO II – Estufa de incubação utilizada para simular as condições de armazenamento a 25°C;

ANEXO III – Equipamento para medição de gases portátil, utilizado para medir as percentagens de gases dentro das embalagens;

ANEXO IV – Secador de tabuleiros utilizado para a secagem do bacalhau após a aplicação do E223;

ANEXO V – Folha de resposta utilizada pelos inquiridos durante a realização dos testes sensoriais.

8.1 ANEXO I



Figura 1 – Embaladora a vácuo, HENKELMAN, modelo Boxer série 42. (Fonte: Própria)

8.2 ANEXO II



Figura 2 – Estufa de Incubação Heratherm IGS 400, ThermoScientific (Fonte: Própria)

8.3 ANEXO III



Figura 3 – Analisador de gases portátil Witt-Gasetechnik, Oxybaby 6.0, Witten, (Fonte: Própria)

8.4 ANEXO IV



Figura 4 – Secador de tabuleiros, Armfield (Fonte: Própria)

8.5 ANEXO V

Teste de Preferência



Sexo:

Idade:

Data: dd/mm/2013

Indicações gerais:

São apresentadas cinco amostras de bacalhau salgado seco codificadas. Avalie globalmente cada uma das amostras segundo o grau de preferência, utilizando a escala indicada.

Grau de satisfação global: Marque com um X a sua opinião de satisfação relativamente a cada uma das amostras.

	653	245	367	896	478
Muito agradável					
Agradável					
Indiferente					
Desagradável					
Muito desagradável					

Das cinco amostras qual compraria?

653	245	367	896	478	Nenhuma

OBRIGADO

Figura 5 – Teste de preferência (Fonte: Própria)