



***INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO SAZONAL NO VALOR NUTRICIONAL E
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA OSTRA DO SADO***

Ângela Marina Serrenho Coutinho

2012



***INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO SAZONAL NO VALOR NUTRICIONAL E
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA OSTRAS DO SADO***

Ângela Marina Serrenho Coutinho

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

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

Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da ostra do Sado

Copyright © 2012 de Angela Marina Serrenho Coutinho

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Instituto Politécnico de Leiria

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

Não posso deixar de expressar o meu reconhecimento e agradecimento a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a sua realização. Em particular:

Ao professor Doutor José Pestana, de um modo muito especial, todo o apoio, incentivo e disponibilidade na orientação durante toda a realização deste projecto. Agradeço todo o acompanhamento do trabalho experimental e escrito e todos os conhecimentos científicos que me transmitiu.

À professora Doutora Maria Manuel Gil, pela sua disponibilidade e apoio não só na realização deste projecto como ao longo de todo o mestrado.

Agradeço ainda a toda a equipa técnica da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar.

Resumo

Em Portugal, a produção de ostra *Crassostrea gigas* assume particular importância em zonas estuarinas tal como o Estuário do Sado. As ostras não só apresentam interesse gastronómico como também interesse nutricional. Com o presente estudo pretendeu-se verificar a existência de diferenças no valor nutricional das ostras em três épocas do ano e estabelecer o tempo de prateleira das ostras à temperatura de refrigeração de ± 5 °C. Para a determinação do valor nutricional e tempo de prateleira recorreu-se aos métodos de referência. Considerando o chumbo e o cádmio como um potencial perigo químico presente neste tipo de alimento, procedeu-se também à sua determinação. A composição nutricional das ostras do Sado variou de 74% - 78% de humidade, apresentou cerca de 11% de proteína, 2% - 3% de gordura e cinza, e apresentou maiores teores de sódio (188 - 300 mg/100 g) do que fósforo e potássio. A concentração em metais pesados analisados nas ostras encontrou-se abaixo dos teores máximos permitidos. O tempo de prateleira foi revelado pelo teor de azoto básico volátil total (ABVT), índice de ácido tiobarbitúrico (TBA), pH e cumprimento dos critérios microbiológicos estabelecidos legalmente. Durante nove dias de conservação em refrigeração (± 5 °C) a degradação proteica da ostra não apresentou alterações significativas, a oxidação lipídica ocorreu ao terceiro dia com uma possível influência na qualidade da ostra e não houve variações significativas no valor de pH. A ausência de *Salmonella* e *E.coli* nas ostras analisadas durante os nove dias de conservação em refrigeração permitiu assegurar os critérios de segurança alimentar legalmente estabelecidos. Os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo permitiram estabelecer um tempo de prateleira das ostras em refrigeração (± 5 °C) até nove dias.

Palavras-chave: variação sazonal, valor nutricional, ostra do Sado, avaliação da estabilidade

Abstract

In Portugal, the *Crassostrea gigas* oyster production has particular importance in estuaries, like the Sado Estuary. Oysters do not only present gastronomic interests but nutritional interests as well. The present study aims to verify the existence of differences in the nutritional value of oysters in three seasons and establish the shelf life of oysters at refrigeration temperature of about ± 5 ° C. To determine the nutritional value and shelf life using the reference methods. It has been determined lead and cadmium as a potential chemical hazard present in this type of food. The nutritional composition of oysters from Sado ranged from 74% - 78% moisture, 11% protein, 2% - 3% of fat and ash, and a higher amount of sodium (188 - 300 mg / 100 g) than phosphorus and potassium. The concentration of heavy metals analyzed in oysters was found to be below the maximum allowed levels. The shelf life was obtained by the content of total volatile basic nitrogen (TVB-N), thiobarbituric acid index (TBA), pH according to legal microbiological criteria. During nine days of storage under refrigeration (± 5 ° C) the protein degradation oyster showed no significant changes, lipid oxidation occurred on the third day with a possible influence on the quality of the oyster and there were no significant changes in pH. The absence of *Salmonella* and *E. coli* in oysters analyzed during the nine days of storage under refrigeration allows food safety criteria established by legislation. The results obtained in the experimental conditions of this study allowed to establish a shelf life of oysters under refrigeration (± 5 ° C) of up to nine days.

Keywords: seasonal variation, nutritional value, Sado oyster, shelf life evaluation

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Capítulo 1 . Introdução	1
1.1 Produção de ostra em Portugal	1
1.2 Biologia da espécie estudada	2
1.2.1. Nutrição	3
1.2.2. Reprodução	3
1.2.2.1. Ciclo de vida	4
1.2.3. Habitat	4
1.3 Composição bioquímica e valor nutricional da ostra	5
1.3.1. Valor nutricional da Ostra	5
1.3.1.1. Humidade	6
1.3.1.2. Proteína	6
1.3.1.3. Lípidos	6
1.3.1.4. Hidratos de carbono	7
1.3.1.5. Minerais	7
1.3.1.5.1. Sódio	7
1.3.1.5.2. Potássio	8
1.3.1.5.3. Fósforo	8
1.3.1.6. Vitaminas	8
1.3.1.7. Metais pesados	9
1.3.1.7.1. Chumbo	9
1.3.1.7.2. Cádmio	10
1.4 Composição microbiológica das Ostras	11
1.5 Avaliação da qualidade dos moluscos bivalves	11
1.6 Aspetos da qualidade associados aos moluscos bivalves vivos	12
1.6.1. Alterações químicas	13
1.6.1.1. pH	13
1.6.1.2. Compostos azotados voláteis (ABVT - azoto básico volátil total)	13
1.6.1.3. Oxidação	14
1.6.2. Contaminantes microbiológicos	15
1.6.2.1. Bactérias indígenas	15
1.6.2.2. Bactérias não indígenas	16
1.6.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	16

1.6.2.2.2	<i>Salmonella sp.</i>	17
1.6.3.	Controlo dos contaminantes dos bivalves.....	18
Capítulo 2 . Objetivos.....		21
Capítulo 3 . Material e métodos.....		23
3.1.	Avaliação sazonal do valor nutricional e dos contaminantes ambientais	23
3.1.1.	Ostra	23
3.1.2.	Dados biométricos	23
3.1.3.	Preparação da amostra de ostra.....	24
3.1.4.	Identificação da espécie de ostra.....	24
3.1.5.	Determinações analíticas.....	24
3.1.5.1.	Composição nutricional.....	24
3.1.5.2.	Determinação da humidade.....	25
3.1.5.3.	Determinação da proteína bruta	25
3.1.5.4.	Determinação da gordura total	27
3.1.5.5.	Determinação do teor de cinza	29
3.1.5.6.	Determinação dos minerais	29
3.1.5.6.1.	Determinação de potássio, sódio, chumbo e cádmio	30
3.1.5.6.2.	Determinação do teor total de fósforo	31
3.1.6.	Avaliação da qualidade da ostra durante a refrigeração.....	33
3.1.6.1.	Constituição e preparação da amostra	33
3.1.6.2.	Determinação do pH.....	33
3.1.6.3.	Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT)	33
3.1.6.4.	Determinação do teor de ácido tiobarbitúrico (TBA).....	35
3.1.7.	Avaliação microbiológica dos indicadores de segurança alimentar	37
3.1.7.1.	Constituição e preparação da amostra	37
3.1.7.2.	Preparação do diluente e dos meios de cultura.....	38
3.1.7.3.	Enumeração de <i>Escherichia coli</i>	38
3.1.7.4.	Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	40
3.1.8	Análise Estatística.....	42
Capítulo 4 . Resultados e discussão		43
4.1.	Dados biométricos.....	43
4.2.	Composição nutricional	44
4.2.1	Humidade.....	45
4.2.2	Proteína.....	45
4.2.3	Gordura	45
4.2.4	Minerais.....	46

4.2.4.1	Teor de cinza.....	46
4.2.4.2	Sódio	46
4.2.4.3	Potássio.....	46
4.2.4.4	Fósforo	47
4.2.4.5	Metais pesados	47
4.2.4.5.1	Chumbo e cádmio	47
4.3.	Avaliação da qualidade da ostra do Sado.....	48
4.3.1	pH	48
4.3.2	ABVT	49
4.3.3	TBA.....	50
4.4.	Avaliação microbiológica da ostra do Sado	51
4.4.1	<i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>	52
Capítulo 5 . Conclusão e perspectivas futuras		53
Capítulo 6 . Bibliografia		55

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1 . Introdução

Figura 1.1: Produção e vendas nos mercados nacionais e internacionais de <i>C. gigas</i>	2
Figura 1.2: Anatomia da <i>C. gigas</i>	3
Figura 1.3: Ciclo de vida da ostra	4
Figura 1.4: Redução de TMAO a TMA	13
Figura 1.5: Processos básicos envolvidos na oxidação dos ácidos gordos polinsaturados	14

Capítulo 3. Material e métodos

Figura 3.1: Biometria da ostra	23
--------------------------------------	----

Capítulo 4 . Resultados e discussão

Figura 4.1: Valores de ABVT representante da deterioração da ostra durante 9 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	50
Figura 4.2: Valores de TBA representantes da deterioração da ostra durante 9 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)	51

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1 . Introdução

Tabela 1.1: Taxonomia da ostra	2
Tabela 1.2: Dados da literatura da composição nutricional da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	5
Tabela 1.3: Teores máximos de contaminantes nos moluscos bivalves.....	9
Tabela 1.4: Critérios de segurança relativamente aos moluscos bivalves vivos.....	18

Capítulo 3. Material e métodos

Tabela 3.1: Adição de reagentes aos tubos para determinação do índice de TBA.....	36
---	----

Capítulo 4 . Resultados e discussão

Tabela 4.1: Variação sazonal dos dados biométricos	43
Tabela 4.2: Variação sazonal da composição nutricional da ostra.....	44
Tabela 4.3: Deterioração da ostra durante 9 dias de armazenamento em refrigeração (± 5 °C)	48
Tabela 4.4: Escala de pH representante da qualidade microbiana das ostras	49

LISTA DE SIGLAS

INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
SSO	<i>Specific Spoilage Organisms</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CCMVSP	Comité Científico das Medidas Veterinárias relacionadas com a Saúde Pública
ESTM	Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar
USDA	<i>United States Department of Agriculture, National Agricultural Library</i>
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>

INTRODUÇÃO

Capítulo 1 . Introdução

1.1 Produção de ostra em Portugal

Em Portugal a produção de ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) realizava-se ao longo de toda a Costa, formando nos Estuários do Tejo, Sado e Ria Formosa, os maiores bancos de ostras nacionais, contribuindo de uma forma significativa para os níveis da produção de ostra a nível mundial, até finais dos anos 60, através da sua exportação principalmente para França e para as estâncias balneares inglesas (1, 2).

Na década de 70 do século passado a *Crassostrea angulata* desapareceu quase por completo do mercado devido a uma epidemia animal de natureza viral com origem na poluição da água que levou à substituição desta espécie pela *Crassostrea gigas*, originária do Japão (3, 4). Esta é uma espécie com uma notável resistência às alterações do meio ambiente, possui um crescimento rápido e elevada fecundidade, todavia, o seu crescimento, sobrevivência e qualidade estão diretamente relacionados com as condições ambientais a que a cultura de ostra está sujeita (5, 6).

As águas do estuário do Sado são ricas em nutrientes promovendo índices de crescimento das ostras bastante superiores comparativamente às do norte europeu (4). O crescimento das ostras na costa portuguesa realiza-se ao longo de todo o ano, embora a hidroclimatologia e o afloramento das águas no outono e primavera proporcionem um crescimento mais rápido em detrimento dos meses de junho a agosto (5, 7).

O hábito de consumo de ostras cruas na alimentação humana representa um problema de saúde pública quando as águas dos ambientes costeiros e estuarinos, onde decorre todo o seu ciclo de vida, estão contaminadas. Estes moluscos devem ser ingeridos após a sua passagem por centros depuradores para diminuir o risco de contaminação microbiana (8).

Como descrito pelo Instituto Nacional de Estatística (INE, 2012) a ostra é o segundo molusco mais vendido dentro do grupo dos moluscos e crustáceos, estando a amêijoia em primeiro lugar nas vendas e o mexilhão em terceiro. A produção de ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) não foi constante desde o ano de 2005 (figura 1.1) porém, em 2009-2010 diminuiu cerca de 32,4% em relação aos restantes anos (2005 - 2009) o mesmo não se verificou para as vendas que aumentaram cerca de 49%, o que significa que a comercialização de *C. gigas* teve um crescimento bastante significativo (9-14).

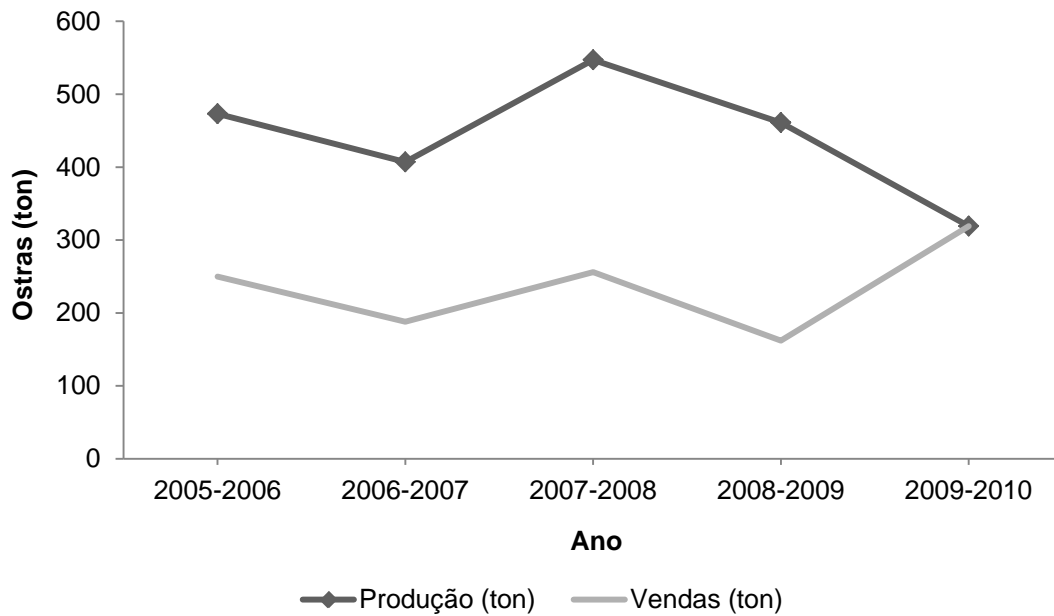


Figura 1.1: Produção e vendas nos mercados nacionais e internacionais de *C. gigas* (9-14)

1.2 Biologia da espécie estudada

A ostra é um molusco bivalve que se desenvolve em águas marinhas ou estuarinas. As ostras pertencem à ordem Ostreoida, família Ostreidae como consta na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Taxonomia da ostra (Thunberg, 1793) (15)

Reino	Animalia
Filo	Mollusca
Classe	Bivalvia
Ordem	Ostreoida
Família	Ostreidae
Gênero	<i>Crassostrea</i>
Espécie	<i>Crassostrea gigas</i>

As ostras possuem um corpo mole que está dentro de uma concha fechada por fortes músculos adutores. A Figura 1.2 representa a anatomia da ostra *C. gigas* onde se

observa o lobo esquerdo onde se reconhece o manto esbranquiçado e sobre o mesmo, duas brânquias esverdeadas situadas do mesmo lado. Do lado oposto estão o músculo adutor, o coração e o aparelho digestivo (16).

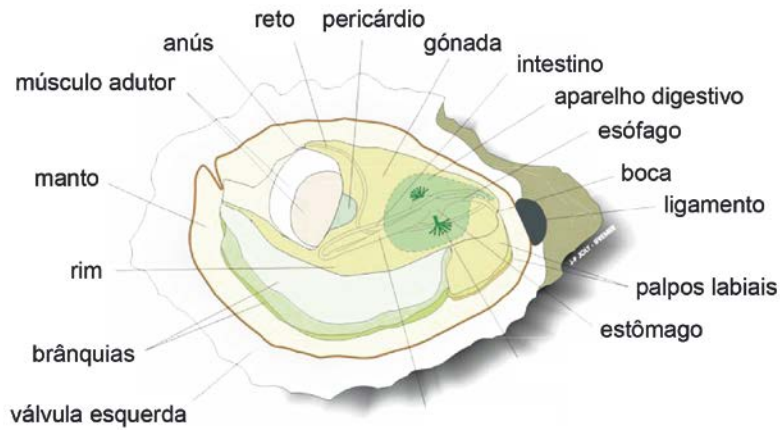


Figura 1.2: Anatomia da *C. gigas* adaptado de Miossec *et al.* (2009)

1.2.1. Nutrição

A ostra é um bivalve filtrador, ingerindo essencialmente o fitoplâncton que se encontra em suspensão na coluna de água ou outras partículas como, materiais orgânicos e inorgânicos (17).

1.2.2. Reprodução

As ostras do género *Crassostrea* são hermafroditas, em cada época de desova os organismos podem mudar de sexo. Um mesmo indivíduo pode desovar como macho numa desova e na seguinte desovar como fêmea, ou vice-versa. Possuem um elevado nível de fecundações produzindo até cerca de 120 milhões de ovos por ano (18).

1.2.2.1. Ciclo de vida

Nas espécies do género *Crassostrea*, os gâmetas (ovócitos e espermatozoides) são libertados diretamente na água, onde ocorre a fecundação. De seguida as células vão-se dividindo ocorrendo o desenvolvimento embrionário até atingir a forma larval, passadas 12 horas. Após 24 horas da fecundação a larva assume um formato que lhe fornece aptidão para se alimentar e deslocar. Quando completam cerca de 22 dias, as larvas deixam de ser planctónicas, sofrem modificações morfológicas que lhes permite fixarem-se num substrato ideal. Uma vez fixadas, sofrem uma metamorfose, assumindo a forma definitiva de uma ostra jovem. Neste substrato elas crescem até atingirem o tamanho ideal para a sua comercialização que, dependendo das condições, pode ser alcançado entre 18 a 30 meses (Figura 1.3) (18, 19).

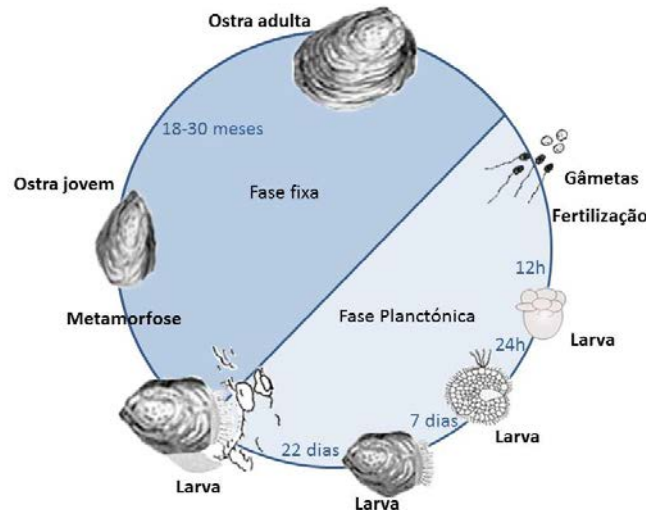


Figura 1.3: Ciclo de vida da ostra, adaptado de Tirapé *et al.* (2007)

1.2.3. Habitat

A *C. gigas* é uma espécie de estuário, preferindo substratos (madeira, ferro, barcos naufragados entre outros) ou rocha onde levam uma existência sedentária até profundidades de 40 m. Não obstante, as ostras são também encontradas em fundos lodoso ou arenoso. A gama de salinidade ótima em termos de crescimento de *C. gigas* é de 18 a 32 ppm (17).

É uma espécie de clima temperado, no entanto é tolerante a uma vasta gama de temperaturas que variam de -1,8 a 35 °C (17).

1.3 Composição bioquímica e valor nutricional da ostra

1.3.1. Valor nutricional da Ostra

A parte edível da ostra corresponde a cerca de 10% do seu peso total, é uma fonte de vitamina A e B12, proteína e sais minerais, como zinco, ferro, cobre e magnésio (20, 21).

A composição bioquímica da *C. gigas* possui uma variação sazonal influenciada por diversos fatores, temperatura, qualidade e quantidade fitoplâncton, poluentes ambientais, fase do ciclo reprodutivo e do armazenamento e distribuição das reservas metabólicas nas diferentes fases de crescimento e reprodução (22-24). Na tabela 1.2 estão enumerados outros autores que pesquisaram a sazonalidade na composição nutricional da *C. gigas* em diferentes regiões bem como um estudo português efetuado pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA, 2006) onde estabeleceram os valores de referência para o valor nutricional da ostra.

Tabela 1.2: Dados da literatura da composição nutricional da ostra *Crassostrea gigas*

Autor	País	Humidade (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Glicogénio (%)	Cinza (%)
Deslous-Paoli <i>et al.</i> (1988)	França	70,0-86,0	29,0-52,0	6,0-20,0	1,1-2,8	10,0-23,0
Kang <i>et al.</i> (2000)	Coreia	74,5-88,4	40,5-66,8	2,5-11,6	2,2-33,0	9,5-23,0
Ren <i>et al.</i> (2003)	Nova Zelândia	–	40,0-63,0	1,0-8,0	2,0-8,0	–
Dridi <i>et al.</i> (2007)	Tunisia	–	9,5-21,4	4,9-8,0	2,1-11,5	–
INSA (2006)	Portugal	83,0	8,6	1,7	3,9	2,7

1.3.1.1. Humidade

A água é o principal constituinte da ostra e corresponde a cerca de 80% (tabela 1.2), esta percentagem é influenciada pelo ciclo reprodutivo. Normalmente na desova a quantidade de água aumenta enquanto outros constituintes tais como a proteína e os lípidos diminuem (28).

1.3.1.2. Proteína

Segundo Huss (1995) a proteína do pescado têm um elevado valor biológico na nutrição humana, na medida em que contém alguns aminoácidos essenciais fundamentais para os requisitos nutricionais do homem. A proteína possui um papel funcional e estrutural nas nossas células e fornecem energia ao organismo (29).

Na ostra os níveis de proteína mantem-se estáveis no inverno, surgindo um aumento na primavera quando ocorre a gametogénese, ainda assim, os níveis diminuem ao longo do processo de maturação da gametogénese atingindo níveis mínimos no final do verão (início da desova total) (22, 26, 7). A quantidade de proteína também é influenciada pela qualidade e quantidade do fitoplâncton.

1.3.1.3. Lípidos

O teor de gordura na ostra é muito variado (tabela 1.2), depende da qualidade e quantidade fitoplâncton, da fase do ciclo reprodutivo e da época do ano.

Os lípidos acumulam-se nas gónadas até ao final da gametogénese (período máximo de maturação), que corresponde ao final da primavera. Quando a temperatura da água aumenta, durante o verão, ocorre a desova (emissão dos gâmetas) e conseqüentemente diminui o valor lipídico devido ao elevado valor energético dos gâmetas (22, 26).

Da mesma forma que a proteína, a abundância de alimento disponível no outono promove um aumento da concentração de lípidos na ostra por forma a assegurar a recuperação do peso da sua parte edível. O período de pós-desova é crítico para a saúde da ostra pois a sua atividade antibacteriana diminuiu significativamente (7).

A ostra tal como a maioria do pescado é uma fonte de ácidos gordos polinsaturados ómega-3 essenciais para a nutrição humana, ajuda no desenvolvimento e crescimento, assim como na prevenção de doenças coronárias (30, 28).

1.3.1.4. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono nos moluscos estão basicamente sob a forma de glicogénio e, conseqüentemente a deterioração microbiana resulta em atividades fermentativas que, principalmente na ostra vão influenciar o pH da parte edível (31).

1.3.1.5. Minerais

Os minerais constituem cerca de 4% do peso corporal humano (ossos e dentes) e a sua principal fonte são os alimentos. Os minerais são essenciais ao nosso organismo, intervêm no transporte de nutrientes a outras moléculas, regulam a atividade enzimática e mantêm o equilíbrio ácido-base e pressão osmótica. Diariamente o organismo necessita de alguns minerais em quantidades elevadas (na ordem dos mg/dia), como são exemplo o cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio, cloro e enxofre. O sódio, potássio e fósforo foram quantificados na composição nutricional da ostra e possuem diferentes funções no nosso organismo, como descrito nos pontos seguintes (32).

1.3.1.5.1. Sódio

O sódio é um metal alcalino presente na maioria dos alimentos ingeridos diariamente visto que a sua principal fonte é o sal de cozinha (32). O valor diário de referência para uma dieta de 2000 kcal é de 2,4 g de sódio (33) sendo que a ostra, possui cerca de 374 mg/100 g (27). No nosso organismo é o responsável pela manutenção da pressão osmótica do fluido extracelular e pela ativação de enzimas como a amilase (21).

1.3.1.5.2 Potássio

O potássio é um metal alcalino do mesmo modo que o sódio e é responsável pelo equilíbrio hidroeletrolítico. Intervém na transmissão de impulsos nervosos, contração muscular e regulação do ritmo cardíaco. É encontrado em alguns frutos, legumes, cacau e pescado (32). Como referido pelo INSA (2006) a ostra possui 258 mg/ 100 g de potássio e a dose diária recomendada é de 2000 mg (33).

1.3.1.5.3 Fósforo

O fósforo é um componente presente em todos os seres vivos e pode ser encontrado tanto na forma de fosfatos inorgânicos como na forma de ésteres orgânicos. O seu papel no organismo é muito importante na medida em que é fundamental para o crescimento, manutenção e reparação de todos os tecidos, ossos e dentes, para o transporte de nutrientes através das membranas celulares e para o armazenamento de energia (32).

A ostra possui 144 mg/100 g de fósforo (27) e a dose diária recomendada, como referenciado no Decreto-Lei n.º 54/2010 é de 700 mg.

O teor de cinza (fração mineral dos compostos inorgânicos) na ostra varia com o seu ciclo de maturação sexual, diminuindo regularmente desde o início até ao fim da gametogénese, tal como a proteína. No entanto, com a emissão dos gâmetas o teor de cinza aumenta e a percentagem de lípidos diminui (22).

1.3.1.6. Vitaminas

As ostras são uma boa fonte de vitamina A e vitaminas do complexo B. O consumo diário de alimentos ricos em vitaminas é imprescindível para o homem porque o nosso organismo não consegue sintetizar a maioria das vitaminas e estas são necessárias para as várias reações metabólicas que se processam no nosso organismo (34).

1.3.1.7. Metais pesados

Os alimentos muitas vezes constituem uma fonte de substâncias químicas tóxicas. As ostras na sua constituição podem possuir metais pesados como é o caso do chumbo, mercúrio e cádmio que apresentam riscos de segurança alimentar relevantes, com origem industrial (antropogénica) ou naturalmente através da constituição da crosta terrestre (geogénica) (35).

Os metais pesados com origem antropogénica entram na cadeia alimentar devido a contaminação dos solos e sedimentos por parte das indústrias de combustão de carvão, fundições e incineração de resíduos. A presença dos metais pesados com origem geogénica na alimentação humana provém da contaminação dos solos, rios, lagos e mares através de processos naturais de erosão das formações rochosas. Estes contaminantes são tóxicos em concentrações elevadas e tendem a acumular-se tanto no ambiente como nos vários intervenientes da cadeia alimentar pois são estáveis e não podem ser degradados nem destruídos, representando um risco para a saúde humana. Os efeitos na saúde caracterizam-se pela redução no crescimento e desenvolvimento, cancro e danos no sistema nervoso, sendo as crianças um grupo particularmente sensível. A presença destes contaminantes nos alimentos é assim inevitável contudo, a ingestão de níveis reduzidos pode ser inofensiva para a saúde humana (35). Os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios estão legislados, na tabela 1.3 são apresentados os teores correspondentes aos moluscos bivalves de chumbo e cádmio, abaixo dos quais o risco para a saúde é baixo (36).

Tabela 1.3: Teores máximos de contaminantes nos moluscos bivalves

Elemento	Teores máximos	Fonte
Chumbo	1,5 (mg/kg de peso fresco)	Regulamento (CE)
Cádmio	1 (mg/kg de peso fresco)	N.º 1881/2006

1.3.1.7.1 Chumbo

O chumbo é um contaminante ambiental que tem vindo a ser controlado desde o ano de 1970 através da implementação de medidas para regular os níveis de chumbo na

gasolina, tintas e recipientes para armazenamento de alimentos (37). Este contaminante pode estar presente em alguns géneros alimentícios e a sua ingestão leva a sua acumulação no organismo podendo afetar praticamente todos os sistemas do corpo. Quando o nosso organismo está exposto a quantidades significativas de chumbo (níveis de chumbo igual ou superior a 80 µg/dl de sangue), podem ocorrer episódios de convulsões, coma ou até mesmo morte. A exposição a níveis mais baixos de chumbo pode causar efeitos adversos nos rins e células do sangue e alterações no sistema nervoso central. Níveis de chumbo no sangue muito baixos (10 µg/dl de sangue) podem prejudicar o desenvolvimento físico e mental (38).

1.3.1.7.2 Cádmi

As vias mais comuns de exposição ao cádmio são a inalação (tabaco) e a ingestão (água e alimentos). O cádmio pode estar presente em alimentos que são consumidos diariamente, assim como, leite, ovos, carne, peixe, moluscos, fruta, vegetais e cereais (39).

O cádmio assim como o chumbo é bioacumulável e permanece no organismo durante longos anos sendo considerado um metal altamente tóxico. O cádmio pode apresentar diferentes níveis de toxicidade (39). A toxicidade aguda verifica-se quando ocorre exposição ocasional a quantidades significativas de cádmio e caracteriza-se por náuseas fortes, vômitos e diarreia, salivação excessiva e contrações abdominais. Em casos mais graves pode levar à morte em 7 - 14 dias por falência renal e depressão cardiopulmonar ou em 24 horas através da acidose metabólica. A exposição prolongada (toxicidade crónica) leva preferencialmente à acumulação do cádmio no fígado e rins mas pode atingir vários órgãos e tecidos podendo provocar insuficiência renal, lesões hepáticas, desregulação do metabolismo de reabsorção óssea, diminuição funcional dos espermatozoides, cancro nos pulmões (normalmente via inalação) e próstata (39).

A dose abaixo da qual o risco para a saúde é baixo encontra-se estimada em 3 mg e a dose letal para os humanos está compreendida entre os 350 e 8900 mg (39).

1.4 Composição microbiológica das Ostras

A flora microbiana das ostras é muito variável e reflete o seu meio ambiente no entanto, em vários estudos a microflora dominante pertence a bactérias gram-negativas nomeadamente *Pseudomonas* e à família Vibrionaceae (40-42, 31). Cao *et al.* (2009) verifica que a *Pseudomonas* faz parte dos organismos específicos da degradação das ostras (SSO - Specific Spoilage Organisms) proliferando-se significativamente ao longo do seu armazenamento em refrigeração (5 °C) enquanto os índices de Vibrionaceae se mantêm. Alguns autores consideram a *Pseudomonas* como a bactéria mais importante na deterioração das ostras (31, 43) em contrapartida, é uma bactéria patogénica invasiva logo raramente causa doenças num sistema imunológico saudável, mas em hospedeiro susceptível pode ser altamente virulento e provocar até a morte. Faz parte da flora microbiana normal do homem, sendo o intestino humano um grande reservatório (44).

1.5 Avaliação da qualidade dos moluscos bivalves

Cada vez mais na nossa sociedade, os consumidores, industriais do sector e autoridades de saúde pública dão mais relevância à qualidade dos produtos alimentares. Com o aumento das doenças provocadas por alimentos, houve necessidade de melhorar os meios que asseguram a qualidade dos alimentos bem como a legislação que protege a saúde dos consumidores, os seus interesses e a segurança e qualidade dos géneros alimentícios (45).

A definição do termo “qualidade” é subjectiva e depende do produto em questão, no entanto existe um conjunto de atributos que são comuns nas diversas definições (46), tais como salubridade, capacidade de satisfação dos consumidores, valor nutricional, iguaria gastronómica, preço e características organolépticas.

A salubridade nos moluscos bivalves que se consomem vivos é particularmente importante, os profissionais das entidades competentes verificam-na avaliando as características organolépticas dos produtos determinando a sua frescura. Perante o consumidor o atributo que se destaca é a frescura pois determina a sua aceitabilidade e conseqüentemente, o valor comercial do produto. A avaliação da qualidade do pescado também pode ser efetuada através de métodos analíticos: análises microbiológicas, pH,

azoto básico volátil total (ABVT), ácido tiobarbitúrico (TBA) e composição química do alimento (42, 47).

Os moluscos bivalves filtradores alimentam-se do plâncton e restante microflora, ocorre uma acumulação e concentração de metais pesados, bactérias e vírus provenientes da contaminação da água circundante do estuário costeiro e a sua imobilidade torna-os susceptíveis a contaminação fecal (48). Contudo, apesar de serem consumidos crus, os bivalves sofrem uma depuração antes de serem comercializados de forma a reduzir a contaminação microbiana (49).

1.6 Aspetos da qualidade associados aos moluscos bivalves vivos

O número de SSO e a concentração dos seus metabolitos, podem ser usados como índices de qualidade objetivos para a determinação do tempo de prateleira do pescado refrigerado (41, 47), bem como o pH e o ABVT. Segundo Jay (2000) há autores que defendem que devido a composição bioquímica das ostras, rica em glicogénio, a medição do decréscimo do pH é um teste de deterioração das ostras melhor que a determinação das bases voláteis totais (31), não obstante, no estudo efetuado por Cao *et al.* (2009) existe uma relação entre o valor considerado limite de ABVT (30 mg N/100 g) e de microrganismos totais (107 ufc / g), acima dos quais os produtos da pesca são considerados impróprios para consumo humano enquanto o valor de pH se manteve quase inalterado, ocorrendo apenas uma diminuição ligeira ao longo dos 14 dias estudados (50, 51, 43).

Huss *et al.* (1997), citado por Gonçalves (2010) refere que existe uma fraca correlação entre o tempo de prateleira e os microrganismos totais no pescado mas, este normalmente é o mais utilizado porque é dispendioso determinar o conjunto de bactérias responsável pela deterioração de pescado, exige alguns estudos sensoriais, microbiológicos e químicos (52).

1.6.1.3. Oxidação

As alterações que ocorrem na fração lipídica do pescado são responsáveis pela sua deterioração química. O processo de oxidação envolve o oxigénio e os ácidos gordos polinsaturados e está representado na figura 1.5. Primeiro surge a formação de hidroperóxidos que de seguida se degradam dando origem à formação de aldeídos e cetonas. Estes compostos conferem ao pescado um sabor forte a ranço. A oxidação é influenciada pelo calor, luz e várias substâncias orgânicas e inorgânicas (Cu e Fe) que aceleram o processo. Alguns antioxidantes apresentam o efeito oposto, como o alfa-tocoferol, o ácido ascórbico, o ácido cítrico e os carotenoides.

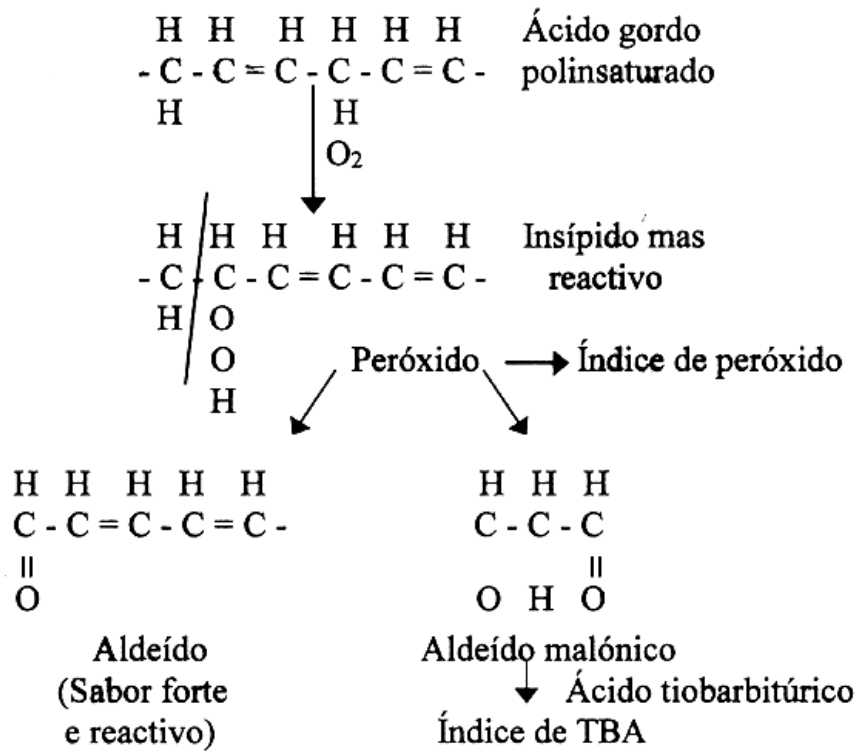


Figura 1.5: Processos básicos envolvidos na oxidação dos ácidos gordos polinsaturados (45)

A formação de compostos oxidados secundários (oxidação lipídica) de diversos alimentos é normalmente determinada através do índice de ácido tiobarbitúrico (47) que reage com o aldeído malónico (MDA) formando um composto corado vermelho cuja absorvância é medida em espectrofotómetro (53).

1.6.2. Contaminantes microbiológicos

A flora microbiana dos moluscos é um reflexo do meio aquático onde se encontram, uma vez que são seres filtradores de grandes volumes de água acumulando concentrações microbianas superiores às que se encontram na água filtrada (45). Para a saúde pública existem dois grupos relevantes de bactérias que contaminam os moluscos bivalves: as bactérias naturalmente presentes no ambiente (*Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *Listeria monocytogenes*) e as enterobactérias proveniente da contaminação da água com resíduos humanos (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.* e *Escherichia coli*) (31). Jay (2000) determina que coliformes de origem fecal e *E. coli* fornecem informações seguras sobre as condições higiênico-sanitárias da ostra e da água onde estas se encontram, uma vez que a *E. coli* representa cerca de 90% dos coliformes fecais indicadores de contaminação de origem fecal.

As ostras são na maioria das vezes consumidas cruas o que aumenta o risco de doenças transmitidas por alimentos contaminados por microorganismos potencialmente patogênicos para o consumidor, especialmente quando estes moluscos derivam de águas contaminadas ou são tratadas sob condições higiene-sanitárias precárias. As doenças provocadas pela ingestão de moluscos contaminados podem ser de origem bacteriana, viral, parasitária ou de biotoxinas (45). Num estudo epidemiológico de infecções provocadas pelo pescado notificadas no *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* entre o ano de 1973 e 2006 nos Estados Unidos, ocorreram 85 surtos de infecções associadas aos moluscos, dos quais 72 foram provocados por ostras. Dos 85 surtos, 50 tiveram origem em agentes bacterianos, 34 de origem viral e 1 de origem parasitária (55).

De seguida são enumerados alguns agentes responsáveis pelas doenças que têm sido associados ao consumo de pescado de acordo com Huss (1994).

1.6.2.1. Bactérias indígenas

As bactérias pertencentes a este grupo encontram-se em vários ambientes aquáticos incluindo os estuários. São bactérias saprófitas, nativas dos bivalves onde podem crescer e produzir toxinas patogênicas para o homem. A maioria das bactérias indígenas

transmitidas pelos moluscos bivalves provoca doenças gastrintestinais e pertencem ao género *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*. (44).

O regulamento (CE) n.º 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, não inclui critérios microbiológicos para bactérias indígenas. No entanto, a *Food and Drug Administration* (FDA) tem tolerância zero para o *V. vulnificus* nos produtos da pesca (57).

“O Comité Científico das Medidas Veterinárias Relacionadas com a Saúde Pública (CCMVSP) adoptou um parecer sobre *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* em 19 e 20 de Setembro de 2001. O comité concluiu que os dados científicos atualmente disponíveis não justificam o estabelecimento de critérios específicos para a presença de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* patogénicos no peixe e marisco embora tenha recomendado o estabelecimento de códigos de práticas, a fim de assegurar a aplicação de boas práticas de higiene” (56).

1.6.2.2. Bactérias não indígenas

As enterobactérias são microrganismos mesófilos encontrados no solo, água e vegetação, fazem parte da flora intestinal da maioria dos animais e ambientes poluídos com excrementos humanos ou animais (58). *E. coli* e *Salmonella sp.* são enterobactérias que sobrevivem e multiplicam-se em ambientes estuarinos durante semanas, assim como em ambientes poluídos por matéria fecal ou esgotos (45).

Os membros desta família são bacilos Gram-negativos, móveis ou imóveis, anaeróbios facultativos, fermentam a glicose, reduzem o nitrato e são catalase positivas e oxidase negativas. A *Escherichia coli* fermenta a lactose ao contrário da *Salmonella* que não possui essa capacidade (44).

1.6.2.2.1 *Escherichia coli*

E. coli possui estirpes comensais as quais fazem parte da flora intestinal dos animais, desempenhando um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal. Contudo dentro desta espécie existem estirpes, transmitidas por alimentos, que são potenciais

patogénicos para o homem. Estas estirpes patogénicas actuam inicialmente no intestino e grande parte possui a capacidade de produzir enterotoxinas. Podem causar doenças diarreicas e infeções do trato urinário que podem ser muito prejudiciais (59).

Para distinguir os vários tipos de *E. coli* recorre-se a genética molecular, apesar de não existir nenhum marcador fenotípico específico para separar as estirpes patogénicas das não patogénicas, existem algumas propriedades atípicas comuns entre as estirpes patogénicas, o fato de serem lactose-negativas ou incapazes de produzir indol a 44 °C permite fazer a distinção (45). Da mesma forma que a *Salmonella*, a gravidade das doenças provocadas pelas estirpes patogénicas variam com o agente patogénico (estirpe e quantidade de células viáveis ingeridas) e com o individuo (idade, estado nutricional e sistema imunitário) (59). A dose infecciosa descrita na literatura é de 10^1 - 10^3 células viáveis (45).

Não há indicação de que o pescado seja uma fonte relevante de infeção por *E. coli*. A maior parte das infeções está relacionada com a contaminação da água ou com o manuseamento do produto alimentar em condições pouco higiénicas (45). Num estudo epidemiológico de infeções provocadas pelo pescado entre o ano de 1973 e 2006 nos Estados Unidos, ocorreu apenas um surto provocado por *E. coli* através do consumo de crustáceos, no consumo de moluscos não existe nenhum caso registado (55).

1.6.2.2.2 *Salmonella sp.*

As principais fontes de *Salmonella* transmitidas por alimentos são os tractos intestinais de seres humanos e de outros animais endotérmicos. Os animais filtradores, como as ostras, também podem ser um potencial transmissor quando provenientes de meios aquáticos poluídos (59).

A ingestão de alimentos contendo 10^5 - 10^8 células viáveis de *Salmonella* resulta na colonização dos intestinos delgado e grosso. O início da doença ocorre 8 - 48 horas após a ingestão do alimento e os principais sintomas da salmonelose (infeções não tifóides) são diarreia não sanguínea, dores abdominais, febre, náuseas e vômitos. No entanto, a dose infecciosa é influenciada por fatores relacionados com o agente patogénico (espécie e quantidade de células viáveis ingeridas) e com o individuo (idade, estado nutricional e sistema imunitário) (59).

Num estudo epidemiológico de infeções provocadas pelo grupo dos moluscos entre o ano de 1973 e 2006 nos Estados Unidos, apenas 22% dos surtos foram provocados por *Salmonella* dos quais 18% das pessoas foram hospitalizadas e 8,5% apresentaram sintomas de salmonelose (55).

A maioria das espécies de *Salmonella* são patogénicas para o homem manifestando-se através de uma doença gastrointestinal (salmonelose) proveniente dos alimentos. Os sintomas manifestam-se logo após a colonização do epitélio intestinal pelo microrganismo patogénico.

No que diz respeito às especificações microbiológicas, *Salmonella* e *E. coli* são as espécies a controlar nos moluscos bivalves vivos segundo o regulamento (CE) n.º 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. A tabela 1.4 indica os limites máximos admitidos para os critérios de segurança relativamente aos moluscos bivalves vivos.

Tabela 1.4: Critérios de segurança relativamente aos moluscos bivalves vivos

Microrganismo	Limites	Fonte
<i>Salmonella</i>	Ausência em 25g do alimento	Regulamento (CE) N.º 2073/2005
<i>E. coli</i>	230 NMP/100 g de carne e de líquido intravalvar do alimento	

1.6.3. Controlo dos contaminantes dos bivalves

Os contaminantes fecais que causam doença ao homem através da ingestão de moluscos bivalves vivos proveem da poluição das águas, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período. Um tratamento adequado da água e a eliminação sanitária dos esgotos são, por isso, essenciais no controlo das doenças causadas por estes microrganismos provenientes da ingestão dos bivalves vivos. Assim a produção dos moluscos em zonas com níveis de contaminação baixos seguida da depuração,

assegurar um nível muito baixo de contaminantes fecais. Este processo permite eliminar de forma efetiva muitas bactérias fecais contaminantes quando os bivalves possuem um nível de contaminação baixo ou moderado, e de uma forma menos efetiva para o norovírus e o vírus da hepatite A. No entanto, na eliminação de outros contaminantes como por exemplo *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, biotoxinas marinhas, metais pesados e substâncias químicas orgânicas, este processo tem uma eficácia constante e não é efetivo. Para que o processo de depuração ocorra como esperado, é necessário que os moluscos se manipulem adequadamente durante a recolção, transporte e armazenamento. Uma boa higiene dos manipuladores, instalações e equipamentos é igualmente essencial num programa de controlo (49).

A identificação e vigilância das zonas de cultivo de ostras são muito importantes para a identificação e controlo dos perigos. Os indicadores bacterianos de contaminação fecal como os coliformes fecais e a *E. coli*, ajudam a avaliar o risco da presença de patogénicos de natureza bacteriana e viral. A *E. coli* é cada vez mais utilizada como indicador específico de contaminação fecal (49).

A redução do risco de contrair doenças derivadas ao consumo de ostras começa no local de recolção, o qual deve possuir níveis baixos de contaminação microbiana. A depuração também contribui bastante para a redução de muitos contaminantes, todavia, possui algumas limitações nomeadamente na redução dos níveis de vírus e vibrios de origem marinha nos moluscos. A depuração por si só, não é suficiente para os moluscos provenientes de zonas mais contaminadas ou contaminadas por hidrocarbonetos, metais pesados, pesticidas e biotoxinas marinhas (49).

OBJETIVOS

Capítulo 2 . Objetivos

Neste trabalho, pretende-se estudar o valor nutricional da ostra do Sado em três estações do ano (outono, inverno e primavera) e avaliar a sua estabilidade durante a conservação em refrigeração à temperatura de ± 5 °C.

- a) Avaliar o valor nutricional da ostra recolhida no Estuário do Sado através da análise do teor de humidade, teor de proteína bruta, teor de gordura total, teor de cinza e teores de fósforo, potássio e sódio.
- b) Avaliar a presença de contaminantes ambientais como o chumbo e cádmio da ostra do Sado.
- c) Conhecer a qualidade da ostra durante a refrigeração à temperatura de ± 5 °C recorrendo à avaliação bioquímica de alguns parâmetros como a medição do valor de pH, determinação dos teores de azoto básico total (ABVT) e de ácido tiobarbitúrico (TBA).
- d) Pesquisar a presença de *Salmonella* e enumerar os coliformes fecais/*E.coli* durante a refrigeração à temperatura de ± 5 °C.
- e) Verificar a existência de diferenças no valor nutricional das ostras em três épocas do ano.
- f) Estabelecer o tempo de prateleira das ostras em refrigeração à temperatura de ± 5 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo 3 . Material e métodos

3.1.Avaliação sazonal do valor nutricional e dos contaminantes ambientais

3.1.1. Ostra

As Ostras (*Crassostrea gigas*) utilizadas eram provenientes do estuário do Sado e foram cedidas pela empresa Bivalve 7 (onde a média de salinidade foi de 27 - 30 ppm). Foram transportadas em condições de refrigeração, em geleira com couvete de gelo para o laboratório de tecnologia alimentar da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM).

3.1.2. Dados biométricos

Realizou-se a determinação dos dados biométricos da ostra intacta nomeadamente o comprimento (figura 3.1), o peso bruto e o peso da casca. Abriram-se as ostras e pesou-se o miolo de cada uma individualmente. Para tal, recorreu-se a um paquímetro para efetuar a medição com precisão de milímetro e a uma balança (Philips HR2391/00) com precisão de 1 g.

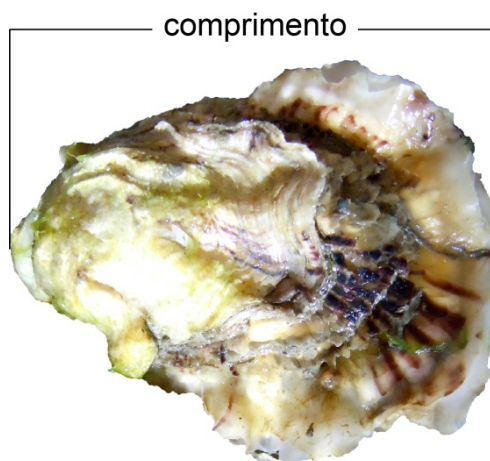


Figura 3.1: Biometria da ostra

3.1.3. Preparação da amostra de ostra

Foram realizadas 3 amostragens em diferentes estações do ano, outono de 2011, inverno e primavera de 2012, de forma a verificar as variações sazonais da composição nutricional das ostras *Crassostrea gigas*.

Separaram-se as ostras vivas em dois lotes. Abriam-se, removeram-se a parte edível e trituraram-se de forma a obter uma polpa homogénea. Utilizou-se uma máquina de picar Moulinex para a homogeneização da amostra. Conservou-se um dos lotes em câmara de refrigeração, à temperatura aproximada de 5 °C, para proceder imediatamente às análises e outro em câmara de congelação, à temperatura aproximada de -20 °C para realização de eventuais determinações. As tomas de amostra para as diferentes determinações foram pesadas numa balança (Mettler Toledo AB204-S) com precisão de 0,0001 g.

3.1.4. Identificação da espécie de ostra

A identificação da espécie de ostra foi efetuada pelos técnicos de biologia marinha da instituição, recorrendo a guia de identificação da espécie (60).

3.1.5. Determinações analíticas

O grau de pureza dos reagentes utilizados nas análises químicas era adequado aos diferentes tipos de determinação. A água utilizada nas determinações e na preparação de soluções aquosas foi produzida num aparelho Sartorius (AG Göttingen Arium 61315). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

3.1.5.1. Composição nutricional

Determinaram-se os teores de humidade (NP 2282/1991), cinza (NP 2032/1988), proteína bruta (NP 4488/2009) e gordura total (NP 1974/1992) de acordo com os métodos de referência descritos nas normas.

3.1.5.2. Determinação da humidade

Fundamento do método:

Determinação da humidade por gravimetria tendo como base a norma NP 2282/1991. O método reside na secagem da toma até obtenção de massa constante.

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Estufa de secagem (Binder) a 105 °C
- Caixas de Petri de vidro de fundo plano
- Exsicador

Procedimento:

Pesa-se 10 g de amostra para uma caixa Petri e seca-se em estufa de 12 - 18 horas. Deixa-se arrefecer a amostra em exsicador e pesa-se novamente. Repetem-se as operações de secagem e arrefecimento até obtenção de peso constante. A humidade do produto expressa em gramas por 100 g de amostra é obtida pela seguinte equação:

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

m1: massa em grama da caixa Petri

m2: massa em grama da caixa Petri e toma para análise

m3: massa em grama da caixa Petri e toma para análise após secagem

3.1.5.3. Determinação da proteína bruta

Fundamento do método:

Esta determinação compreende três fases: digestão, destilação e titulação. Na primeira fase ocorre a mineralização da amostra pelo ácido sulfúrico concentrado na presença de um catalisador da reação e alcalinização do extrato por adição de hidróxido de sódio. Na

segunda fase dá-se a destilação por arrastamento de vapor para libertação do amoníaco e sua receção numa solução de ácido bórico. Por fim, na última fase surge a titulação do amoníaco com ácido clorídrico. O teor de azoto total é convertido em proteína bruta através do fator de conversão de 6,25 conforme descrito na norma NP 4488/2009.

Reagentes:

- Ácido sulfúrico concentrado 98% de pureza (Sigma)
- Solução de hidróxido de sódio a 40% (m/V) (Panreac)
- Solução de ácido bórico (Panreac) a 4% (m/V) com indicador incorporado:
 - o Solução de indicador vermelho de metilo (Acros)
 - o Solução de indicador verde de bromocresol (Himedia)
- Solução de ácido clorídrico 0,1 N (36,5% m/m) (Merck)
- Sulfato de amónio 99,9% de pureza (Merck)
- Substância-padrão Triptofano (Merck)
- Sacarose (Fisher Sci.)

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Estufa de secagem (Binder) a 105 °C
- Digestor a 200 °C e 400 °C (2006 FOSS)
- Tubos de Kjeldahl
- Destilador (Kjeltec 2100 FOSS)
- Erlenmeyers
- Bureta de precisão 0,05 cm³

Procedimento:

Pesa-se 0,5 g de amostra para papel de filtro, coloca-se o papel de filtro com a amostra dentro dos tubos de digestão com ácido sulfúrico e catalisador. Inicia-se a digestão da amostra no digestor à temperatura de 220 °C, durante 30 minutos e 400 °C, durante 90 minutos). Deixa-se arrefecer e no aparelho de Kjeldahl procede-se à alcalinização do extrato por excesso de hidróxido de sódio a frio. Destila-se por arrastamento de vapor

para libertação do amoníaco e sua receção em erlenmeyers com solução de ácido bórico. Para calcular o teor de azoto total, efetua-se uma titulação do destilado obtido (amónia produzida) com solução de ácido clorídrico. Paralelamente a este ensaio, efetua-se um ensaio em branco (substituindo a amostra por 1 g de sacarose) e um ensaio para verificar a eficiência da digestão (substituindo a amostra por 0,15 g de triptofano e 0,7 g de sacarose).

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

Cálculo do teor de azoto total (NT):

$$\left[\frac{0,014 \times (Va - Vb) \times 0,1}{m} \right] \times 100$$

Va: o volume, em mililitros, da solução de ácido clorídrico de título conhecido, gasto na titulação da amostra

Vb: o volume, em mililitros, da solução de ácido clorídrico de título conhecido, gasto na titulação do branco

m: massa, em grama, da toma para análise

N = 0,1 N: concentração, expressa em normalidade, da solução de ácido clorídrico

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

3.1.5.4. Determinação da gordura total

Fundamento do método:

Extração da gordura total das amostras de ostra por meio da libertação da fração lipídica pela adição de ácido clorídrico fervente. Filtração, secagem do papel de filtro e extração da matéria gorda em aparelho de Soxhlet pelo éter de petróleo. Evaporação do solvente, secagem e pesagem do extrato.

Reagentes:

- Solução de ácido clorídrico 4 mol/dm³ (36,5% m/m) (Merck)

- Papel azul de tornesol
- Éter de petróleo 40-60 °C (Labscan)

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Estufa de secagem (Binder) a 105 °C
- Aparelho de Soxhlet (Behrotest ET2) a 120 °C
- Evaporador rotativo (Heidolph ® Laborota 4000 efficient) a 40 °C e 90 rpm
- Cartuchos de extração
- Exsicador
- Placa de aquecimento (P Selecta Agimatic - E)
- Balões de fundo redondo

Procedimento:

Pesa-se cerca de 5 g de amostra e adiciona-se 50 ml de HCl, mistura-se e deixa-se hidrolisar fervendo durante 10 minutos. Adiciona-se cerca de 150 ml de água e filtra-se. Efetuam-se lavagens ao material até que os líquidos de lavagem não deem reação ácida ao papel azul de tornesol. Seca-se o filtro em estufa durante 1 hora. Extrai-se a gordura com éter de petróleo, num aparelho de Soxhlet, durante 120 minutos.

Recolhe-se a fase orgânica para um balão de fundo redondo, previamente seco em estufa e pesado. Evaporam-se os solventes orgânicos num evaporador rotativo e seca-se o resíduo de gordura em estufa até atingir peso constante.

O teor de matéria gorda total, expresso em gramas por 100 g da amostra:

$$(m_2 - m_1) \times \frac{100}{m}$$

m: massa, em gramas, da toma para análise

m1: massa, em gramas, do balão de extração

m2: massa, em gramas, do balão de extração com o extrato após secagem

3.1.5.5. Determinação do teor de cinza

Fundamento do método:

Determinação do teor de cinza por gravimetria tendo como base a norma NP 2032/1988. Este método assenta na secagem da toma em estufa seguida de incineração.

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Estufa de secagem (Binder) regulável a 105 °C
- Cadinhos de porcelana
- Exsicador
- Mufla (Nabertherm; Controller B170) a 500 °C

Procedimento:

Pesa-se 5 g da amostra para um cadinho e seca-se em estufa durante 12 - 16 horas. Incinera-se a amostra em mufla durante 4 horas, deixa-se arrefecer em exsicador e pesa-se. O teor de cinza, expressa em percentagem massa é obtida pela seguinte equação:

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

m1: massa, em gramas, do cadinho

m2: massa, em gramas, do cadinho com a toma

m3: massa, em gramas, do cadinho com a cinza

3.1.5.6. Determinação dos minerais

Os métodos utilizados tiveram de ser otimizados através de uma análise preliminar para determinação das concentrações das soluções padrão.

3.1.5.6.1. Determinação de potássio, sódio, chumbo e cádmio

Fundamento do método:

Determinação dos minerais potássio, sódio, chumbo e cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama.

O método baseia-se na secagem da amostra, incineração do resíduo, branqueamento, hidrólise ácida da cinza com ácido nítrico, filtração e diluição, seguidas de medição em espectrofotómetro de absorção atômica.

A espectrofotometria de absorção atômica com chama usa como princípio a absorção de radiação por parte dos eletrões que, quando excitados emitem uma energia que por sua vez absorve a radiação emitida pela lâmpada de cátodo oco do elemento químico a quantificar.

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Estufa de secagem (Binder) regulável a 105 °C
- Cadinho de porcelana
- Exsicador
- Mufla (Nabertherm; Controller B170) a 400 °C
- Mufla (Nabertherm; Controller B170) a 500 °C
- Espectrofotómetro de absorção atômica com chama (Thermo Electron Corporation)
- Placa de aquecimento (P Selecta Agimatic - E)
- Balões volumétricos

Reagentes:

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

- Solução de ácido nítrico a 15%
- Solução de ácido nítrico a 5%

Procedimento:

Pesa-se 5 g da amostra para um cadinho e seca-se em estufa durante 12 - 16 horas. Incinera-se a amostra em mufla a 500 °C durante 4 horas. Realiza-se a hidrólise ácida da cinza com ácido nítrico a 65%, evapora-se o ácido e leva-se à mufla a 400 °C durante 30 minutos para branqueamento da cinza, filtra-se e diluiu-se em ácido nítrico a 15%.

Para a quantificação dos metais pesados, chumbo e cádmio utiliza-se uma escala de concentrações do padrão de 0,3 ppm; 0,5 ppm; 0,8 ppm; 1 ppm e 1,5 ppm.

Para a quantificação dos minerais, potássio e sódio na amostra, devido a estes estarem presentes em concentrações mais elevadas que os metais pesados, efetua-se uma diluição da amostra de 1:100 e utiliza-se uma escala de concentrações do padrão de 1,5 ppm; 2,5 ppm; 3,5 ppm; 4,5 ppm e 5,5 ppm.

Aspira-se cada uma das soluções padrão e amostra diluída no espectrofotómetro e efetua-se a leitura no comprimento de onda correspondente (potássio - 766,5 nm, sódio - 589,0 nm, chumbo - 217,0 nm e cádmio - 229,5 nm).

3.1.5.6.2. Determinação do teor total de fósforo

Fundamento do método:

O método compreende a secagem da amostra, incineração do resíduo e hidrólise ácida da cinza com ácido nítrico, filtração e diluição, seguidas da formação de um composto amarelo após adição de reagente colorimétrico. Medição em espectrofotómetro a 430 nm.

Reagentes:

- Solução de ácido nítrico (65%) 1 + 2 (v/v) (Panreac)
- Reagente colorimétrico

- Solução de monovanadato de amónio 2,5 g/ l (Fluka)
- Solução de heptamolibdato de amónio 50 g/ l (Scharlau)
- Solução padrão de fosfato (P_2O_5) a 500 mg/ l
 - Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (Labsolve)

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Estufa de secagem (Binder) regulável a 105 °C
- Cadinho de porcelana
- Exsicador
- Mufla (Nabertherm; Controller B170) a 500 °C
- Espectrofotómetro a 430 nm (Thermo Electron Corporation - Helina)
- Placa de aquecimento (P Selecta Agimatic - E)
- Balões volumétricos
- Vidros de relógio

Procedimento:

Pesa-se 5 g da amostra para um cadinho e seca-se em estufa durante 12 - 16 horas. Incinera-se a amostra em mufla a 500 °C durante 4 horas e deixa-se arrefecer em exsicador. Reconstitui-se a cinza com ácido nítrico e leva-se à ebulição durante 8 minutos, diluiu-se e filtra-se. Adiciona-se o reagente colorimétrico a 5 ml do filtrado, desta mistura obtém-se a formação de um composto amarelo que é medido por espectrofotómetro. Tal como para a determinação dos outros minerais foi criada uma escala padrão de fósforo de 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml e 50 µg/ml.

O resultado da composição da ostra em minerais é revelado em mg/100 g e dos metais pesados em ppm e resulta dos valores obtidos através da curva de calibração.

3.1.6. Avaliação da qualidade da ostra durante a refrigeração

3.1.6.1. Constituição e preparação da amostra

As ostras utilizadas neste ensaio foram depuradas durante 48 horas. De seguida foram transportadas em refrigeração para o laboratório. Conservaram-se em câmara de refrigeração (± 5 °C) durante um período de 9 dias, nos quais foram efetuadas seis amostragens intercaladas, no dia 0 (controlo), dia 2, dia 3, dia 5, dia 7 e dia 9. A determinação de ABVT e TBA foi executada em duplicado e, paralelamente a estes ensaios foi realizado um ensaio de controlo de difusão e um ensaio em branco.

Em cada amostragem, abriram-se as ostras, removeu-se a parte edível e triturou-se de forma a obter uma polpa homogénea. Utilizou-se uma máquina de picar Moulinex para a homogeneização da amostra. Conservaram-se as restantes ostras em câmara de refrigeração com temperatura controlada a ± 5 °C, para as posteriores amostragens.

3.1.6.2. Determinação do pH

O pH da ostra foi medido através dum potenciómetro (pH meter basic 20 crisen) após triturar e homogeneizar 10 g da parte edível da ostra com 20 ml de água destilada.

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

Fundamento do método:

Determinação do teor de ABVT utilizando o método de microdifusão de Conway de acordo com a norma NP 2930/1988. O método consiste no doseamento do ABVT presente na amostra através da obtenção dum extrato por homogeneização da amostra com ácido tricloroacético e adição de carbonato de potássio, que permite libertar as bases voláteis. As bases voláteis são rececionadas no ácido bórico que posteriormente é titulado com ácido clorídrico.

Reagentes:

- Solução de ácido tricloroacético a 5% (m/v) (Merck)
- Álcool etílico a 95% (Panreac)
- Solução de hidróxido de sódio 0,1N (Panreac)
- Solução de ácido clorídrico 0,02 N (36,5% m/m) (Merck)
- Solução de sulfato de amónia a 0,1% (m/V) (Panreac)
- Solução de ácido bórico (Panreac) com indicador incorporado:
 - o Solução de indicador vermelho de metilo (Acros)
 - o Solução de indicador verde de bromocresol (Himedia)
- Solução saturada de carbonato de potássio (Fisher Sci.)
- Lubrificantes

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Células de Conway
- Estufa de secagem (Binder) a 40 °C
- Microbureta graduada em 0,02 cm³
- Centrífuga (Eppenderf centrifuge 5804 R) a 3000 rpm

Procedimento:

Pesa-se 25 g de amostra e extrai-se as bases voláteis com uma solução de TBA a 5%, numa proporção de 1:2 (m/v) e homogeneiza-se durante 2 minutos. Filtra-se o extrato e armazena-se o filtrado a -20 °C até à determinação analítica. Para proceder à determinação analítica descongela-se o extrato e de imediato inicia-se o processo de determinação. Centrifuga-se o filtrado de forma a obter uma solução límpida (\pm 5 minutos). Coloca-se 1 ml de ácido bórico com indicador na parte central da célula do tipo Conway e na coroa circular 1 ml do filtrado, 0,5 ml de água destilada e 1 ml de uma solução saturada de carbonato de potássio para ocorrer a alcalinização. As células, cobertas por uma tampa de vidro, são incubadas em estufa a 40 °C, durante 90 minutos para que ocorra a libertação das bases voláteis que são rececionadas na solução de ácido bórico. Deixa-se arrefecer e titula-se o azoto fixado com ácido clorídrico (HCl 0,02 N) até ao aparecimento da cor rosa ténue. Em paralelo efetua-se um ensaio em branco

(substituindo a amostra por água destilada) e um ensaio padrão (substituindo a amostra por sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄) a 0,1%) para determinação do coeficiente de difusão do azoto. Os resultados foram expressos em mg/100 g de parte edível da ostra, de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{21 \times (V2 - V0)}{(V1 - V0) \times V3 \times m} (100 + H)$$

V0: volume HCl gasto na titulação do ensaio em branco

V1: volume HCl gasto na titulação do ensaio de controlo de difusão

V2: volume HCl gasto na titulação da amostra

V3: volume da amostra utilizado na determinação

m: massa em grama de toma para análise

H: teor de humidade da amostra (%)

3.1.6.4. Determinação do teor de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Fundamento do método:

Determinação do índice de TBA baseado na norma NP 3356/1990. Esta determinação efetua-se por espectrofotometria através da medição de um complexo corado vermelho formado pela reação do MDA extraído da amostra com o ácido tiobarbitúrico.

Reagentes:

- Solução de ácido tricloroacético a 7,5% (m/v)
 - o Ácido tricloroacético (Merck)
 - o 0,1% ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck)
 - o 0,1% de solução alcoólica de galato de propilo a 5% (m/v)
 - Galato de propilo 98% de pureza (Acros)
- Solução de ácido tiobarbitúrico 0,02 mol dm⁻³ (TBA) (Acros)
- Solução padrão de TEP a 10⁻⁸ mol mL⁻¹
 - o Tetraetoxipropano 10⁻⁵ mol mL⁻¹ (TEP) (Acros)
 - o Ácido tricloroacético a 7,5%
 - o Galato de propilo 98% de pureza (Acros)

- EDTA (Merck)

Equipamentos:

- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S de precisão 0,0001 g)
- Espectrofotómetro a 530 nm (Thermo Electron Corporation - Helina)
- Tubos de ensaio
- Placa de aquecimento (P Selecta Agimatic - E)
- Centrífuga (Eppendorf centrífuga 5804 R) a 3000 rpm

Procedimento:

Pesa-se 15 g de amostra e extrai-se o MDA com uma solução de TBA a 7,5% (m/V) numa proporção de 1:2 (m/v) e homogeneiza-se durante 2 minutos. Filtra-se o extrato e armazena-se o filtrado a -20 °C até à determinação analítica. Para proceder à determinação analítica descongela-se o extrato, centrifuga-se de forma a obter uma solução límpida (\pm 5 minutos) e de imediato inicia-se o processo de determinação. As soluções padrão, solução da amostra a analisar e ensaio em branco executam-se de acordo com o indicado na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Adição de reagentes aos tubos para determinação do índice de TBA

Concentração em aldeído malónico	0,005 μ moles	0,01 μ moles	0,015 μ moles	0,02 μ moles	0,025 μ moles	Branco	Amostra
¹ Solução (TBA) a 7,5% (m/V) (ml)	7	6,5	6	5,5	5	7,5	5
² Solução reagente TBA (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
³ Solução padrão de TEP (ml)	0,5	1	1,5	2	2,5	-	-
Amostra (ml)	-	-	-	-	-	-	2,5

1. Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 7,5% (m/V) contendo 0,1% de galato de propilo e 0,1% de EDTA
2. Solução do reagente TBA a 0,02 mol/L
3. Solução-padrão de TEP a 10^{-8} mol mL⁻¹

Aquecem-se os tubos em banho de água fervente durante 40 minutos para acelerar a reação do MDA com o TBA. Esta reação forma um complexo corado rosa, cuja absorvância é medida em espectrofotómetro.

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

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

c: concentração do aldeído malónico em micromoles (μ moles)

v: volume da toma (ml)

H: humidade da amostra (%)

m: massa da toma de ensaio (g)

3.1.7. Avaliação microbiológica dos indicadores de segurança alimentar

Na realização das análises cumpriram-se as regras gerais descritas na norma ISO 7218:2007. Para ambas as técnicas realizou-se em paralelo um controlo positivo e negativo.

3.1.7.1. Constituição e preparação da amostra

As ostras utilizadas neste ensaio foram depuradas durante 48 horas, de seguida foram transportadas em refrigeração para o laboratório. Conservaram-se em câmara de refrigeração (± 5 °C) durante um período de 9 dias, nos quais foram efetuadas seis amostragens intercaladas, no dia 0 (controlo), dia 2, dia 3, dia 5, dia 7 e dia 9. Procedeu-se à lavagem das conchas com água corrente e à eliminação de toda a sujidade com uma escova. Secaram-se com toalhas de papel absorvente (67). Abriram-se as conchas e removeu-se toda a parte edível e líquido intravalvar para sacos de *Stomacher* estéreis.

3.1.7.2. Preparação do diluente e dos meios de cultura

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

3.1.7.3. Enumeração de *Escherichia coli*

Fundamento do método:

Utilização da técnica do Número Mais Provável (NMP) para enumeração de *E. coli* nas ostras depuradas (68, 67, 69). Após a homogeneização da amostra procede-se à elaboração de quatro etapas: teste presuntivo (coliformes), teste confirmativo (coliformes totais), coliformes fecais e *E. coli*. Os três primeiros testes possuem três diluições decimais seriadas com meios de cultura característicos e através da leitura dos tubos é revelado o resultado na tabela do NMP. Por fim todas as subculturas positivas do caldo *E. coli* são repicadas para meio seletivo e diferencial para realização de provas bioquímicas e enumeração de *E. coli*.

Reagentes:

- Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com concentração dupla (Lauryl Sulphate broth, Merck)
- Caldo verde brilhante lactose bile a 2% (VB) (Brilliant Green Bile Broth 2%, Merck)
- Caldo para *E.coli* (EC, Merck)
- Agar cristal violeta-vermelho bile (VRB) (Violet Red Bile Agar, Himedia)
- Solução salina-peptonada 0,1%
 - Cloreto de sódio (Panreac)
 - Peptona (Merck)
- Agar nutriente (Oxoid)
- Teste API 20E (Biomerieux)

Equipamentos:

- Balança (Kern ew de precisão 0,01g)
- Autoclave (Ajc 88)
- Faca de ostra, Pinça e Espátula esterilizada
- Erlenmeyer
- Pipetas estéreis descartáveis
- *Stomacher* (IUL instruments Nr 2934/500)
- Sacos de *Stomacher* estéreis
- Tubos de ensaio e tubos de fermentação (Durham)
- Ansas estéreis descartáveis
- Caixas de Petri estéreis descartáveis
- Banho com agitação a 44,5 °C (Julabo SW22)
- Estufa (Binder) a 37 °C

Procedimento:

Teste presuntivo

Pesa-se 25 g da amostra e adiciona-se 225 ml de solução salina peptonada (suspensão-mãe, diluição 10^{-1}) e homogeneiza-se no *Stomacher* durante 2 a 3 minutos (70). Prepararam-se diluições decimais até 10^{-3} a partir da suspensão-mãe para tubos contendo caldo de lauril sulfato de concentração dupla e tubo de fermentação. Incubam-se a 37 °C durante 48 horas. Consideram-se suspeitos os tubos que apresentam turvação e produção de gás nos tubos de fermentação ou no meio, quando o tubo é agitado suavemente. Através dos tubos positivos, verifica-se na tabela do NMP o resultado em NMP de coliformes por 10 g de amostra.

Teste confirmativo

Repicam-se os tubos suspeitos utilizando ansas de 10 µl, para tubo contendo caldo verde brilhante, incubam-se em estufa a 37 °C por 48 horas. Consideram-se positivos os tubos com turvação e produção de gás no tubo de fermentação. Pela tabela do NMP determina-se o número de coliformes totais por grama de amostra.

Coliformes fecais (efectuado paralelamente ao teste confirmativo)

Repicam-se os tubos suspeitos para tubo contendo caldo EC e incubam-se em banho-maria com agitação por 24 horas. Neste caso os tubos considerados positivos (produção de gás e turvação) representam a chave para a quantificação de coliformes fecais por grama de amostra através da leitura na tabela do NMP.

E. coli

Para a enumeração de *E. coli* repicam-se todas as subculturas positivas em caldo EC para agar VRB, fazendo estrias por esgotamento. Incuba-se a 30 °C e passadas 24 horas verifica-se o crescimento de colónias típicas de *E. coli*, ou seja, colónias vermelhas com formação de halos de precipitado da bile e com cerca de 1 - 2 mm de diâmetro. Repicam-se as colónias características para placas com agar nutriente e realizam-se as provas bioquímicas através do teste API 20E de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.7.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Resumo de processo

Utilização de uma técnica baseada na norma ISO-6579 para pesquisa de *Salmonella* (71, 72, 69). Esta técnica possui quatro etapas: pré-enriquecimento (meio não seletivo), enriquecimento seletivo, plaqueamento em meio seletivo-indicador e confirmação (provas bioquímicas e serotípicas).

Reagentes:

- Água peptonada tamponada (Merck)
- Solução salina 0,85%
 - Cloreto de sódio (Panreac)
- Caldo selenito-cistina (Merck)
- Caldo Rappaport (Merck)
- Agar Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (Merck)
- Agar Verde Brilhante modificado (BPLS, Merck)

- Agar Kligler (Kligler Iron Agar, Biokar)
- Agar Nutriente (Oxoid)
- Teste API 20E (Biomérieux)

Equipamentos:

- Balança (Kern ew de precisão 0,01g)
- Autoclave (Ajc 88)
- Faca de ostra, Pinça e Espátula esterilizada
- Erlenmeyer
- Pipetas estéreis descartáveis
- *Stomacher* (IUL instruments Nr 2934/500)
- Sacos de *Stomacher* estéreis
- Tubos de ensaio
- Ansas estéreis descartáveis
- Caixas de Petri estéreis descartáveis
- Estufa com agitação rotativa a 37 °C (Stuart orbital incubator SI50)
- Banho-maria a 42 °C (Mettler)
- Estufa (Binder) a 37 °C

Procedimento:

Pré-enriquecimento

Pesa-se 25 g da amostra e adiciona-se 225 ml de água peptonada tamponada, incuba-se em estufa com agitação rotativa durante 24 horas.

Enriquecimento seletivo

Transfere-se alíquotas de 1 ml do pré-enriquecimento para tubo contendo 9 ml de meio seletivo rappaport e para tubo contendo 9 ml de selenito-cistina. Incubam-se durante 18 - 24 horas em banho-maria.

Plaqueamento em meio seletivo-indicador

De seguida com o auxílio de uma ansa retira-se 10 µl de cada tubo do enriquecimento selectivo, realizam-se estrias por esgotamento para placas com meio seletivo-indicador XLD e agar verde brilhante modificado e incubam-se 24 - 48 horas. Após incubação identificam-se as colónias suspeitas de *Salmonella* (meio XLD - colónias da mesma cor do meio, transparentes com ou sem centro negro e meio BPLS - colónias vermelhas ou rosadas com halo vermelho).

Confirmação

Inoculam-se as colónias suspeitas em meio kliger (presença de *Salmonella*: cunha rosada (lactose -), fundo amarelo (glucose +), fundo negro (H₂S +), produção de gás e crescimento ao longo da sementeira) e realiza-se o teste API 20E. Os resultados são expressos em presença/ausência em 25 g de amostra.

3.1.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através dos programas EXCEL © e Statistica 7 ©.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 4 . Resultados e discussão

4.1.Dados biométricos

O desenvolvimento da concha é influenciado pelas condições ambientais e a temperatura da água. Quando a temperatura da água é mais baixa o crescimento da concha é mais lento, assim como para índices de salinidade inferior ou superior à salinidade ótima de crescimento (18 - 32 ppm) (17).

A tabela 4.1 demonstra a variação sazonal no que respeita aos dados biométricos das ostras das três estações em que foi efetuada a captura e do ensaio realizado para avaliar a qualidade da ostra durante a refrigeração. Em geral a variação do comprimento e peso da ostra apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) como se pode observar na tabela 4.1. Exceto os meses novembro e janeiro não revelaram diferenças significativas ($p > 0,05$), em março a ostra apresentou o comprimento e peso mais elevados (8,89 cm e 89,24 g, respetivamente) e em maio, o seu comprimento e peso apresentaram-se significativamente mais baixos (7,23 cm e 64,91 g, respetivamente), mas significativamente maiores que no mês de novembro ($p < 0,05$).

Tabela 4.1: Variação sazonal dos dados biométricos

	outono (novembro) n = 40	inverno (janeiro) n = 30	inverno (março)* n = 41	primavera (maio) n = 32
Comprimento (cm)	6,60 ± 1,08 ^b	6,84 ± 0,85 ^b	8,89 ± 1,01 ^a	7,23 ± 1,18 ^c
Peso (g)	46,97 ± 24,04 ^b	55,30 ± 17,15 ^b	89,24 ± 33,84 ^a	64,91 ± 20,76 ^c
Peso miolo (g)	8,52 ± 3,52	9,67 ± 3,00	16,71 ± 5,24	7,97 ± 3,72
Peso casca (g)	33,00 ± 19,13	39,07 ± 13,82	–	48,41 ± 16,10

* Ensaio da avaliação da qualidade da ostra durante a refrigeração.

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

Os dados biométricos obtidos estão de acordo com Park *et al.* (1989) e Dridi *et al.* (2007). No outono o fato da parte edível da ostra estar menos espessa poderá refletir a escassez de nutrientes sofrida durante o verão. No inverno a parte edível da ostra torna-se mais espessa e mais pesada (tabela 4.1) nos meses novembro e março, que segundo os

autores descritos anteriormente pode ser devida à abundância de alimento e à diminuição da temperatura da água. Tal como descrito anteriormente estes parâmetros são influenciados pela temperatura, salinidade da água e disponibilidade de alimento (22, 26, 23, 73, 24). No verão e início do outono o desenvolvimento do músculo é reduzido principalmente devido ao aumento da temperatura da água e à desova podendo ser agravada com a escassez de nutrientes.

Os resultados obtidos nas condições experimentais estudadas sugerem ainda que a comercialização da ostra capturada nesta área seja efetuada principalmente no inverno pois foi nesta estação do ano que se verificaram valores máximos no peso da ostra.

4.2. Composição nutricional

A variação sazonal da composição nutricional da ostra é apresentada na tabela seguinte:

Tabela 4.2: Variação sazonal da composição nutricional da ostra

	outono (novembro)	inverno (janeiro)	primavera (maio)
	1 ^a Amostragem n = 40	2 ^a Amostragem n = 30	3 ^a Amostragem n = 32
Humidade (%)	74,15 ± 0,20 ^b	78,49 ± 1,35 ^a	78,26 ± 0,10 ^a
Proteína (%)	11,18 ± 0,46 ^a	11,17 ± 0,52 ^a	10,77 ± 0,33 ^a
Gordura (%)	3,38 ± 0,08 ^a	2,18 ± 0,44 ^b	2,07 ± 0,31 ^b
Cinza (%)	3,43 ± 0,37 ^a	2,41 ± 0,33 ^b	2,63 ± 0,02 ^b
Minerais			
Sódio (mg/100 g)	188,44 ± 43,56 ^b	264,33 ± 28,22 ^a	300,22 ± 40,28 ^a
Potássio (mg/100 g)	213,18 ± 60,21 ^a	226,72 ± 17,78 ^{a,b}	177,78 ± 23,83 ^{a,c}
Fósforo (mg/100 g)	121,94 ± 11,79 ^a	90,36 ± 13,59 ^b	99,20 ± 3,63 ^b
Metais pesados			
Chumbo (ppm)	LD	LD	LD
Cádmio (ppm)	0,52 ± 0,11 ^b	0,71 ± 0,04 ^a	0,55 ± 0,08 ^b

LD: abaixo do limite de deteção

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

4.2.1 Humidade

A água corresponde a cerca de 77% da ostra sendo o seu principal constituinte (tabela 4.2). Segundo Murray & Burt (2001) a percentagem de água que a ostra possui sofre variações principalmente na época da desova (verão), época na qual não foi realizada nenhum ensaio. Verificou-se que no outono a ostra apresenta um valor significativamente mais baixo (74,15%) ($p < 0,05$) comparando com as restantes épocas, inverno (78,49%) e primavera (78,26%).

4.2.2 Proteína

No presente estudo não foram verificadas variações significativas ($p > 0,05$) no teor de proteína das ostras (tabela 4.2). O teor de proteína bruta das ostras analisadas foi de 10,77 - 11,17%, próximo dos valores obtidos em estudos anteriores (74, 48, 26, 27).

4.2.3 Gordura

No outono, conforme descrito por Li *et al.* (2009), devido à abundância de alimento disponível, as ostras acumulam os lípidos que desempenham um papel importante como constituintes de membrana e reserva energética para a fase da gametogénese.

O teor de gordura total mais elevado foi registado no outono (3,38%) que pode ser devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes. No entanto, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do teor de gordura total ocorreu no inverno (2,18%) e primavera (2,07%) (tabela 4.2) o que poderá dever-se a gastos energéticos do metabolismo da ostra (22, 26, 7).

Como descrito no estudo efetuado por Dridi *et al.* (2007), também se verificou uma diminuição gradual do teor de gordura, atingindo níveis mínimos na primavera (2,07% em maio) e máximos no outono (3,38% em novembro). Conforme o autor, esta constatação poderá demonstrar o papel dos lípidos no ciclo de vida da ostra que apoiam energeticamente no seu ciclo reprodutivo e em períodos de escassez de alimentos. No outono, potencialmente devido à abundância de alimento, a ostra repõe os níveis energéticos de forma a assegurar os teores nutricionais necessários para um novo ciclo (22, 26, 7).

4.2.4 Minerais

4.2.4.1 Teor de cinza

O teor de cinza (fração mineral dos compostos inorgânicos) neste estudo revelou valores máximos no outono (3,43%) ocorrendo uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao inverno (2,41%) e primavera (2,63%) (tabela 4.2).

Deslous-Paoli *et al.* (1988) menciona que o teor de cinza aumenta com a emissão dos gâmetas (verão) o que parece explicar o resultado obtido no outono (3,43%), podendo refletir a fase após desova.

4.2.4.2 Sódio

Nas ostras a concentração de sódio mais baixa registou-se em novembro (188,44 mg/100 g) com um aumento significativo ($p < 0,05$) em janeiro (264,33 mg/100 g) e maio (300,22 mg/100 g) (tabela 4.2).

A baixa concentração de sódio poderá estar relacionada, conforme Pilkey & Harrissv (1966) citado por Almeida *et al.* (1998), com a diminuição da salinidade da água devido às chuvas refletindo-se na ostra com a diminuição do teor de sódio na sua composição. A salinidade da água do estuário em novembro foi de 27 ppm, atingindo em maio um valor de 30 ppm.

A concentração média de sódio obtida nas ostras analisadas está abaixo do valor diário de referência de 2,3 g para uma dieta de 2000 Kcal referenciada pela *United States Department of Agriculture* (USDA, 2010) e FDA (2000)

4.2.4.3 Potássio

No outono a concentração de potássio nas ostras não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao inverno e primavera. Em contrapartida, verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da concentração de potássio no inverno e primavera (tabela 4.2).

Os valores de potássio encontrados nas ostras estão abaixo da dose diária recomendada, de 2000 mg, conforme o Decreto-Lei nº. 54/2010.

4.2.4.4 Fósforo

No outono foram verificadas concentrações mais elevadas no teor de fósforo das ostras (121,94 mg/100 g) e não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) no inverno e primavera (90,36 mg/100 g e 99,20 mg/100 g, respetivamente) (tabela 4.2). Relativamente aos teores de fósforo os valores encontrados neste estudo estão abaixo da dose diária recomendada de 700 mg, de acordo com o Decreto-Lei nº 54/2010.

Neste estudo observou-se que o sódio, potássio e fósforo das ostras estudadas apresentaram concentrações baixas face ao preconizado para as doses diárias recomendadas pelos organismos oficiais.

4.2.4.5 Metais pesados

4.2.4.5.1 Chumbo e cádmio

Os valores obtidos na quantificação dos contaminantes ambientais, chumbo e cádmio, poderão refletir a qualidade ambiental da zona de captura das ostras, apresentaram-se abaixo do limite máximo permitido (regulamento nº1881/2006). Estes parâmetros estão estabelecidos uma vez que são metais pesados bioacumuláveis e tóxicos (35) e representam uma obrigação legal para a comercialização das ostras. Este resultado indica que nas condições experimentais estudadas as ostras analisadas não iriam produzir nenhum efeito adverso, relacionado com estes contaminantes ambientais, aquando o seu consumo. O estudo efetuado por Almeida *et al.* (1998) em Portugal da influência das variações temporais e locais na composição bioquímica da ostra *Crassostrea gigas* entre julho de 1990 e outubro de 1991 indica que as ostras analisadas possuíam cerca de 3,84 µg/g de cádmio e 48,5 µg/g de chumbo, acima dos teores máximos estabelecidos para estes contaminantes (1 ppm e 1,5 ppm, respetivamente). Como foi referido anteriormente, a *United States Environmental Protection Agency* (EPA)

informa que o chumbo, mesmo para níveis muito baixos no sangue pode prejudicar o desenvolvimento físico e mental (38). A ingestão de níveis inferiores a 3 mg de cádmio, conforme descrito pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE, 2011), apresenta um risco baixo para a saúde (39).

A variação sazonal no valor nutricional das ostras nas diferentes estações do ano é consistente com os resultados obtidos noutros estudos (Deslous-Paoli *et al.*, 1988, Park *et al.*, 1989, Almeida *et al.*, 1998, Dridi *et al.*, 2007 e Li *et al.*, 2009).

4.3. Avaliação da qualidade da ostra do Sado

A frescura é muitas vezes descrita como um índice de avaliação de qualidade dos produtos da pesca e outros, os parâmetros pH, ABVT e TBA contribuem para a avaliação da qualidade (42, 47). Na tabela seguinte exibem-se os resultados obtidos das várias amostragens efetuadas durante nove dias de armazenamento em refrigeração a ± 5 °C.

Tabela 4.3: Deterioração da ostra durante 9 dias de armazenamento em refrigeração (± 5 °C)

	pH	ABVT mg/100 g	TBA mg/1000 g
Dia 0	6,13	3,87	0,00
Dia 2	6,13	3,89	1,79
Dia 3	6,09	3,90	4,57
Dia 5	6,12	6,45	5,93
Dia 7	6,13	6,50	7,96
Dia 9	6,17	10,75	12,28

4.3.1 pH

O valor de pH inicial das ostras frescas depuradas foi de 6,13, durante o armazenamento, o valor de pH variou ligeiramente apesar da variação não ter sido significativa. Segundo Jay (2000) o pH, com a degradação da ostra deveria decrescer ligeiramente. Este autor

estabelece uma escala de pH com o intuito de determinar a qualidade microbiana das ostras (tabela 4.4).

Tabela 4.4: Escala de pH representante da qualidade microbiana das ostras (Jay, 2000)

pH	Qualidade Microbiana
pH 6,2-5,9	Bom
pH 5,8	“Não muito bom”
pH 5,7-5,5	Mofado
pH ≤ 5,2	Azedo ou pútrido

Tendo em consideração a escala de pH da tabela 4.4, os resultados obtidos nas condições experimentais estudadas poderão indicar que as ostras até ao nono dia estudado ainda não possuíam qualquer deterioração na sua qualidade microbiana. Na possibilidade do valor de pH diminuir, poderá ser devido ao nível relativamente elevado de glicogénio nas ostras que é convertido em ácido láctico (50, 31).

4.3.2 ABVT

O ABVT é utilizado para determinar a degradação proteica do alimento muitas vezes causada pelos microrganismos que hidrolisam o azoto que está sob a forma de proteínas no alimento. O doseamento do amoníaco e aminas voláteis revela o índice de frescura do alimento (50).

A *European Food Safety Authority* (EFSA, 2010) e *Cao et al.* (2009) estabelecem valores limite de 25 - 35 mg/100 g para o ABVT acima do qual o pescado é considerado impróprio para consumo, podendo causar um impacto negativo na saúde dos consumidores (50, 78).

Os valores de ABVT nas ostras armazenadas aumentou claramente no quinto (6,45 mg/100 g) e nono (10,75 mg/100 g) dias (figura 4.1), consequência da formação de compostos associados à degradação proteica, não obstante estes valores poderão não influenciar a qualidade das ostras analisadas tendo como referência o valor limite

estabelecido no estudo efetuado pela EFSA (2010), Cao *et al.* (2009) e o regulamento n.º 2074/2005, os quais estabelecem um limite de rejeição dos produtos da pesca de 25 - 35 mg/100 g.

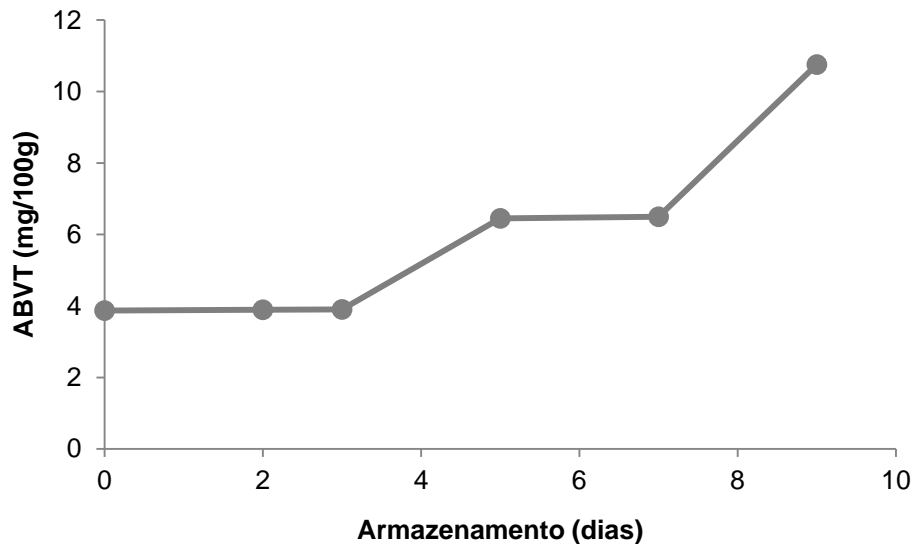


Figura 4.1: Valores de ABVT representante da deterioração da ostra durante 9 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Cao *et al.* (2009) sugere que o fato dos valores de ABVT das ostras serem relativamente baixos mesmo quando o tempo de prateleira se aproxima do prazo estabelecido no estudo, pode ser devido à ostra sofrer uma acidificação geral (50, 31).

4.3.3 TBA

O valor de TBA aumentou gradualmente com o tempo de armazenamento como se pode observar na figura 4.2. No dia zero não se registou alterações no TBA (tabela 4.3 e figura 4.2), do segundo para o terceiro dia de armazenamento em refrigeração verificou-se um aumento mais acentuado na concentração de MDA que segundo Cruz-Romero *et al.* (2008) poderá demonstrar um efeito negativo, devido a oxidação lipídica, na qualidade da ostra (50).

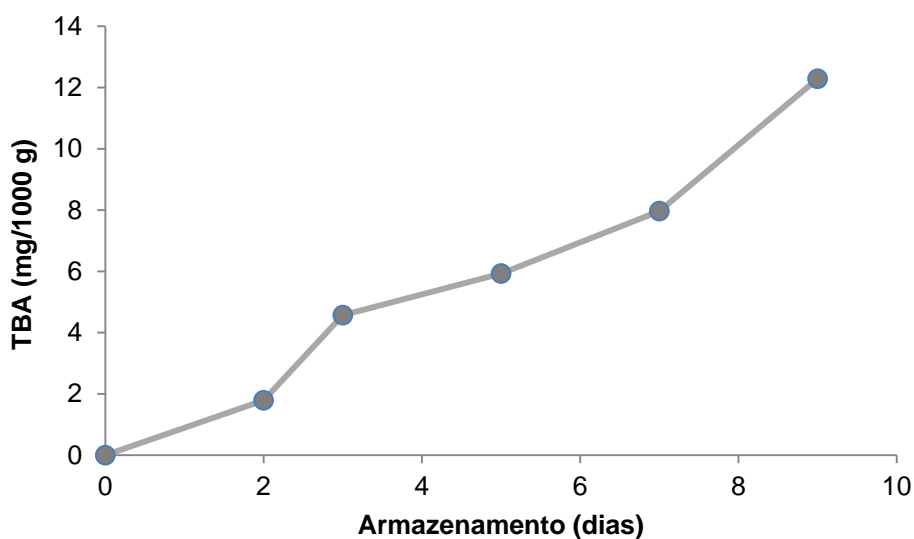


Figura 4.2: Valores de TBA representantes da deterioração da ostra durante 9 dias de armazenamento em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Cruz-Romero *et al.* (2008) refere que normalmente o pescado a partir de 1-2 mg/1000 g de MDA inicia o desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis, contudo o índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) é considerado um parâmetro de qualidade que foca principalmente os aspetos organoléticos causados pela oxidação lipídica (78). Apenas com os ensaios elaborados não podemos inferir qualquer conclusão pois, o valor de TBA é meramente indicativo e não está legislado. Paralelamente ao ensaio de TBA deveriam ter sido realizadas provas sensoriais.

4.4.Avaliação microbiológica da ostra do Sado

No que respeita a segurança alimentar e saúde pública é essencial verificar a existência de enterobactérias provenientes da contaminação da água com resíduos humanos tais como a *Salmonella sp.* e *Escherichia coli* (56).

4.4.1 *E. coli* e *Salmonella*

Neste estudo os coliformes totais, fecais e *E. coli* não foram detetados durante os nove dias de armazenamento das ostras em refrigeração, através da técnica do NMP (69).

O protocolo utilizado para a pesquisa de *Salmonella spp* foi baseado na norma ISO 6579/2002, no terceiro e nono dias de armazenamento observaram-se colónias típicas de *Salmonella* em 25 g de ostra, no entanto esta suspeita revelou-se negativa após a realização dos testes bioquímicos da galeria API 20E. Este resultado era esperado uma vez que as ostras foram depuradas durante 48 horas, de acordo com o exigido pela legislação, tendo este processo terminado no dia da realização do ensaio. Lee *et al.* (2008) menciona que a contaminação dos bivalves depende da contaminação do local de captura e a depuração deve ser efetuada durante um período suficiente para reduzir a contaminação de forma a cumprir os limites legais estabelecidos no regulamento (CE) n.º 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, ou seja, ausência de *Salmonella* em 25 g do alimento e *E. coli* \leq 230 NMP/100 g de carne e de líquido intravalvar do alimento. Lee *et al.* (2008) refere ainda que a depuração elimina de uma forma fácil e efetiva muitas das bactérias fecais contaminantes como *E. coli* e *Salmonella* (49).

Cao *et al.* (2009) determinou um tempo de prateleira da ostra de 6-7, 10-11 e 17-18 dias quando conservadas a 10 °C, 5 °C e 0 °C, respectivamente o que parece ser concordante com o tempo de prateleira até 9 dias em refrigeração (\pm 5 °C) que o presente estudo permite estabelecer.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Capítulo 5 . Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo apresenta de uma forma geral a variação sazonal na composição nutricional das ostras *Crassostrea gigas* recolhidas no estuário do Sado, em Setúbal. Revelou que as flutuações em alguns dos parâmetros analisados são concomitantes com a estação do ano, com o ciclo reprodutivo (armazenamento e distribuição das reservas metabólicas nas diferentes fases de crescimento e reprodução) e parâmetros ambientais, tais como a temperatura, qualidade e quantidade de fitoplâncton e contaminantes ambientais.

Neste estudo observou-se que os teores dos contaminantes ambientais estudados nas ostras analisadas estiveram abaixo dos limites máximos permitidos pela legislação.

Para completar o estudo, deveriam ter sido realizados mais ensaios nomeadamente no verão, contudo os ensaios efetuados nas restantes estações do ano possibilitaram a observação de alguma variação sazonal na composição nutricional das ostras estudadas.

Os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo permitiram estabelecer um tempo de prateleira das ostras em refrigeração (± 5 °C) até 9 dias após determinação do valor de pH, ABVT, TBA, enumeração de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella*.

Na avaliação da estabilidade da ostra seria interessante realizar outros estudos, testar tempos de conservação mais longos e diferentes gamas de temperaturas, realizar a avaliação sensorial da ostra, empregar outras técnicas de conservação e pesquisar outros microrganismos. Porém, estes estudos exigem tempo e são muitas vezes dispendiosos.

Será igualmente interessante complementar o estudo da variação do valor nutricional da ostra com a determinação de outros metais e minerais, executar amostragens noutras meses e estações do ano assim como durante anos consecutivos.

É fundamental continuar os estudos relativos à variação sazonal do valor nutricional das ostras, bem como estudos relacionados com a estabilidade das ostras, só desta sinergia resultará um produto de qualidade, que garanta ao consumidor segurança e qualidade alimentar.

BIBLIOGRAFIA

Capítulo 6 . Bibliografia

1. Aguiar, B.. Tradições colecionáveis - Ostras da Nossa História. Essencial. S.D.
2. Coutinho, M. T. C. P.. Comunidade Fitoplanctónica do Estuário do Sado, Estrutura, Dinâmica e Aspectos Ecológicos: Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas - IPIMAR; 2003.
3. Melo, F.. O regresso da ostra portuguesa. Iguarias. 2006.
4. Teixeira, S. S.. Ostra do Sado - O renascer de uma tradição. Wine Passion. 2007.
5. Ferreira, I. M. M. M. G.. Crescimento e qualidade da ostra (*Crassostera gigas*) em viveiros da Ria Formosa sujeitos a diferentes condições de cultura e situações ambientais: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto; 2003.
6. Sarà, G. & Mazzola, A.. Effects of trophic and environmental conditions on the growth of *Crassostrea gigas* in culture. *Aquaculture*. 1997; 153 (1-2): [81-91 p.].
7. Li, Y., Qin, J.G., Li, X. & Benkendorff, K.. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*. 2009; 286 (1-2): [64-71 p.].
8. Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. & Krieg, N. R.. Microbiology: concepts and applications. New York: McGraw-Hill; 1993.
9. INE. Estatísticas da Pesca 2006. 2007 [Janeiro 2012]; Available from: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=6029989&PUBLICACOESmodo=2.
10. INE. Estatísticas da Pesca 2007. 2008 [Janeiro 2012]; Available from: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=19430629&PUBLICACOESmodo=2.

11. INE. Estatísticas da Pesca 2008. 2009 [Janeiro 2012]; Available from: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=70242037&PUBLICACOESmodo=2.

12. INE. Estatísticas da Pesca 2009. 2010 [Janeiro 2012]; Available from: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=89988890&PUBLICACOESmodo=2.

13. INE. Estatísticas da Pesca 2010. 2011 [Janeiro 2012]; Available from: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=120497634&PUBLICACOESmodo=2.

14. INE. Estatísticas da Pesca 2011. 2012 [Janeiro 2012]; Available from: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=140610972&PUBLICACOESmodo=2.

15. Thunberg. *Crassostrea gigas*. World Register of Marine Species. 1793 [Dezembro 2011]; Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140656>.

16. Miossec, Laurence, Rose-Marie Le Deuff, Philippe Gouletquer. Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific Oyster). International Council for the Exploration of the Sea. ICES Cooperative Research Report. 2009. p. 42.

17. Helm, M. M.. Cultured Aquatic Species Information Programme _ *Crassostrea gigas*. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2005; Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en.

18. Helm, M. M. & Bourne N.. Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO Fisheries Depart. 2004; Available from: <http://www.fao.org/docrep/007/y5720e/y5720e00.htm#Contents>.

19. Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F. & Boulo, V.. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*. 2007; 31 (9): [859 p.].

20. Friedman, Rodney M.. Eat well, stay well. Readers Digest; 1998.

21. W., Belitz H. D. & Grosch.. Food Chemistry. 3 ed: Springer; 2004. 1070 p.

22. Deslous-Paoli J. M. & Héral, M.. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquat Living Resour. 1988: [239-49 p.]; Available from: <http://archimer.ifremer.fr/doc/1988/publication-2872.pdf>.

23. Orban, E., Lena, G. D., Masci, M., Navigato, T., Casini, I., Caproni, R., Gambelli, L. & Pellizzato, M.. Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004; 84 (14): [1929-38 p.].

24. Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H. & Schiel, D. R.. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 2003; 37: [171-82 p.].

25. Keun, K. C., Park M. S., Lee, P. Y., Choi W. J. & Lee W. C.. Seasonal Variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays Korea. Journal of Shellfish Research. 2000; 19 (2): [771-8 p.].

26. Dridi, S., Romdhane, M. S. & Elcafsi, M.. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. Aquaculture. 2007; 263: [238-48 p.].

27. Ricardo Jorge. Tabela da Composição de Alimentos. Instituto Nacional de Saúde. 2006.

28. Murray, J. & Burt, J. R.. The Composition of Fish. FAO, 2001; Available from: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm#Contents>.

29. BBC. Health Protein. 2011; Available from: http://www.bbc.co.uk/health/treatments/healthy_living/nutrition/healthy_protein.shtml.

30. APN, Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Lípidos. 2011; Available from: <http://www.apn.org.pt/scid/webApn/defaultArticleViewOne.asp?articleID=392&categoryID=811>.
31. Jay, J. M.. Modern food microbiology. Gaithersburg, Md: Aspen Publishers. 2000
32. APN, Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Minerais. 2011; Available from: <http://www.apn.org.pt/scid/webapn/defaultArticleViewOne.asp?articleID=390&categoryID=838>.
33. Modifica os requisitos para a rotulagem nutricional dos géneros alimentíssiios, no que diz respeito às doses diárias recomendadas, aos factores de conversão de energia e às definições, Decreto-Lei n.º 54/2010 (28 de Maio de 2010).
34. APN, Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Vitaminas. 2011; Available from: <http://www.apn.org.pt/scid/webApn/defaultArticleViewOne.asp?articleID=388&categoryID=811>.
35. ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). Avaliação de Riscos, Perigos de Segurança Alimentar, Riscos Químicos. 2011; Available from: <http://www.asae.pt/aaaDefault.aspx?f=1&js=0&codigono=596059636142AAAAAAAAAAAAA>
A.
36. Teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, Regulamento (CE) N.º 1881/2006 (19 de Dezembro de 2006).
37. EFSA, European Food Safety Authority. EFSA assesses health implications of lead in food. 2010. [Dezembro 2011]; Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/contam100420.htm>.
38. EPA, United States Environmental Protection Agency. An Introduction to Indoor Air Quality (IAQ), Lead (Pb). [Fevereiro 2012]; Available from: <http://www.epa.gov/iaq/lead.html>.
39. Fernandes, A.S., Caneiras, C., Oliveira, N.G., Costa, J., Cabral, M.F. & Castro, M.. Cádmio: Fontes de exposição e efeitos tóxicos para o homem. ASAE. 2011; Available from:

[http://www.asae.pt/aaaDefault.aspx?back=1&f=1&lws=1&mcna=0&Inc=596059636142AA
AAAAAAAAAA&codigono=541054515453AAAAAAAAAAAA](http://www.asae.pt/aaaDefault.aspx?back=1&f=1&lws=1&mcna=0&Inc=596059636142AAAAAAAAAAAA&codigono=541054515453AAAAAAAAAAAA).

40. Cao, R., Xue, C. & Liu, Q.. Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 131: [272-6 p.].
41. Gram, L. & Huss, H. H.. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 33 (1): [121-37 p.].
42. Huss, H. H.. Quality and quality changes in fresh fish. FAO _ Fisheries and Aquaculture Department: Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 1995 [Junho 2012]; Available from: <http://www.fao.org/DOCREP/V7180E/V7180E00.HTM>.
43. Stannard, C. & Chairman. Development and use of microbiological criteria for foods, Guidance for those involved in using and interpreting microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today*. 1997; 11 (3): [150-65 p.].
44. Murray, P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S. & Pfaller M. A.. *Medical Microbiology*. 4 ed: Saunders; 2002.
45. Huss, H. H.. Assurance of seafood quality Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome: Fisheries and Aquaculture Department. 1994; Available from: <http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768E/T1768E00.HTM>.
46. Bremner, H. A.. Toward practical definitions of quality for food science. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2000; 40 (1): [83-90 p.]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674202>.
47. Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henehan, G., Nielsen, J. & Nielsen, H.. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*. 1997; 8: [258 - 65 p.].

48. Cruz-Romero, M., Kerry, J.P. & Kelly A.L.. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. *Food Control*. 2008; 19: [1139-47 p.].
49. Lee, R., Lovatelli, A. & Ababouch, L.. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO Fisheries and Aquaculture Department Rome*. 2008 [Junho 2012]; 139].
50. Cao, R., Xue, C., Liu, Q. & Xue, Y.. Microbiological, Chemical, and Sensory Assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) Stored at Different Temperatures. *Czech J Food Sci*. 2009; 27 (2): [102-8 p.].
51. ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods Microorganisms in foods, Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. 1986; Available from: <http://pt.scribd.com/doc/17367661/Food-Sampling>.
52. Gonçalves, A. C. Qualidade e valorização em aquacultura, Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves: Universidade de Lisboa; 2010.
53. Pescado - determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.). Método espectrofotométrico, NP 3356:1990 (1990).
54. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Infection Associated with Eating Raw Oysters and Clams Harvested from Long Island Sound -- Connecticut, New Jersey, and New York, 1998 1999 [cited 2012 Junho]; Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00056324.htm>.
55. Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E. & Swerdlow D. L. . Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *American Society for Microbiology*. 2010; 23(2). Available from: <http://cmr.asm.org/content/23/2/399.full>.
56. Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Regulamento (CE) N.º 2073/2005 (15 de Novembro de 2005).

57. general, European commission _ Health & Consumer protection directorate -. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. 2001; Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out45_en.pdf.
58. Collee, J. G., Duguid, J. P. ,Fraser, A. G. & Marmion, B. P. . Microbiologia Médica. 6 ed: Fundação Calouste Gulbenkian; 1993. 1336 p.
59. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. Brock biology of microorganisms. 10 ed: Prentice Hall, Pearson Education; 2003.
60. Saldanha, L.. Fauna submarina Atlântica. 2ed: Europa-América; 1995.
61. Determinação da humidade. Processo de referência, NP 2282/1991 (1991).
62. Determinação do teor de cinza, NP 2032/1988 (1988).
63. Determinação do teor de azoto total e cálculo do teor de proteína bruta, NP 4488/2009 (2009).
64. Determinação do teor da matéria gorda total, NP 1974/1992 (1992).
65. Determinação do teor de azoto básico volátil total (A.B.V.T.). Método de Conway, NP 2930/1988 (1988).
66. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations, ISO 7218:2007 (2007).
67. Keith, I. Compendium of Methods for the Micobiological examination of foods 4ed: American public health association washington; 2001.
68. Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A. & Burkhard, W.. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. FDA - Food and Drug Administration. 2002 [Maio 2012]; Available from: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm064948.htm>.

69. Siqueira, R. S.. Manual de microbiologia de alimentos. Embrapa, Merck; 1995. 159 p.
70. Microbiologia Alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica, NP 1829/1982 (1982).
71. (WHO), World Health Organization. Global Salm-Surv, A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. 2003
72. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*, ISO 6579/2002 (2002).
73. Park, B. H., Park, M. S., Kim, B. Y., Hur, S. B. & Kim, S. J.. Culture of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in the Republic of Korea. FAO. 1989 [Junho 2012]; Available from: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab706e/AB706E00.htm#TOC>.
74. Cruz-Romero, M., Smiddy, M., Hill, C., Kerry, J. P. & Kelly, A. L.. Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters (*Crassostrea gigas*). 2004; 5 (2): [161-9 p.].
75. United States Department of Agriculture, National Agricultural Library - USDA. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals. 2010 [Março 2012]; Available from: http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~/_media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/5_Summary%20Table%20Tables%201-4.pdf.
76. Administration, U.S. Food and Drug. The Nutrition Facts Label. FDA. 2000 [Março 2012]; Available from: <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/NFLPM/ucm274593.htm>.
77. Almeida, M. J., Machado J., Moura G., Azevedo M. & Coimbra J. Temporal and local variations in biochemical composition of *Crassostrea gigas* shells. Journal of Sea Research. 1998; 40:[233-49 p.].

78. European Food Safety Authority, EFSA. Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity. EFSA Journal, 2010; Available from: <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/1874.pdf>.

79. Medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e para a organização de controlos oficiais ao abrigo dos regulamentos (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que derroga o regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e altera os regulamentos (CE) n.º 853/2004 e (CE) n.º 854/2004, 2074/2005 (2005).

