



Dissertação

Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Controlo da Qualidade e Segurança Alimentar do Polvo - *Octopus Vulgaris*

Marcel André Vasco Pereira

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Raul Bernardino, Professor da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar.

Peniche, Setembro de 2012

Controlo da Qualidade e Segurança Alimentar do Polvo - *Octopus Vulgaris*

Marcel André Vasco Pereira

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 este relatório de estágio 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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de Mestrado só foi possível graças ao contributo e colaboração de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de transmitir os meus profundos e sinceros agradecimentos, em especial: ao Professor Doutor Raul Bernardino pela disponibilidade para orientar este trabalho pela preciosa ajuda na definição do objecto de estudo, pela exigência de método e rigor, pela incansável orientação científica, pela revisão crítica do texto, pelos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela cedência e indicação de alguma bibliografia relevante para a temática em análise, pelos oportunos conselhos, pela acessibilidade, cordialidade e simpatia demonstradas, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que, por vezes, se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta dissertação, pelo interesse evidenciado.

À DocaPesca assim como aos hipermercados agradeço a disponibilidade demonstrada para a livre recolha de amostras sem as quais não me seria possível realizar esta dissertação.

Aos técnicos de laboratório e funcionários da Biblioteca da ESTM, pela ajuda técnica personalizada nos trabalhos desenvolvidos assim como nas inúmeras pesquisas efectuadas.

Aos meus colegas e amigos, pelo apoio, colaboração, amizade e espírito de entreaajuda.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais e irmãs, pelo apoio e compreensão, força transmitida assim como pelos inúmeros sacrifícios suportados e pelo constante encorajamento.

Para finalizar um verdadeiro agradecimento a uma pessoa que esteve sempre presente com as suas palavras de apoio tão imprescindíveis. Um muito obrigado por teres sido acima de namorada, uma verdadeira amiga e conselheira.

Aos outros que mais ou menos me influenciaram, o meu apreço e gratidão.

Resumo

A captura do polvo-comum (*Octopus vulgaris*) em Portugal apresenta uma enorme importância económica por ser uma das 5 espécies mais comercializadas em lota em todo o continente (Docapesca, 2012).

Com o aparecimento da ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica em 2006 através do Decreto-Lei nº 237/2005, de 30/12, e tendo em consideração o seu modo bastante activo de actuação foram tornadas públicas inúmeras situações que colocaram em causa a qualidade assim como a segurança alimentar dos alimentos (ASF – ASAE, 2009). Desde então o consumidor tem vindo a demonstrar uma voz ativa no que respeita à qualidade e segurança alimentar, sendo esta uma situação impulsionadora para a elaboração desta dissertação, assim como a necessidade de elaboração de estudos ao nível da qualidade e segurança alimentar em cefalópodes a nível nacional.

Os objectivos da presente dissertação passam pela avaliação da qualidade microbiológica e química, assim como do índice de frescura adaptado ao polvo por Vaz-Pires & Barbosa (2004).

Comparar a qualidade e segurança alimentar do polvo *Octopus Vulgaris* à saída da lota com o polvo-comum *Octopus Vulgaris* que se encontra disponível ao consumidor final na grande distribuição, avaliando o possível decréscimo de qualidade ao longo do tempo.

Verificar se existe uma relação direta entre a contaminação do gelo utilizado na refrigeração e a contaminação presente nos mesmos, de acordo com estudo desenvolvido no âmbito do Projeto Lotaçor 2011 (Geada et al., 2011).

Os resultados permitem concluir que o polvo-comum – *Octopus Vulgaris* transacionado na lota de Peniche, assim como o vendido na grande distribuição ao nível local são de elevada qualidade, contudo existe uma necessidade emergente de implementar/cumprir códigos boas práticas de higiene no sector especialmente na venda em lota.

Palavra-chave: Qualidade, Polvo, *Octopus Vulgaris*, Peniche, Portugal, Grau de frescura

Abstract

The capture of octopus (*Octopus vulgaris*) in Portugal has a huge economic importance as one of the five species most traded in auction across the continent.

With the advent of the ASAE - Food Safety Authority and Economic in 2006 through Decree-Law nº 237/2005 of 30/12, and taking into consideration active action was made public number of situations that jeopardize the quality as well as food safety. (ASF – ASAE, 2009). Since the consumer has shown an active voice in what relates to food safety and quality, which is a driving situation for the preparation of this dissertation, as well as the necessity of conducting cephalopods studies in the level of quality and food safety.

The objectives of this dissertation are to evaluate the quality microbiological and chemical quality, and the degree of freshness method, adapted to octopus by Vaz-Pires and Barbosa (2004).

To compare the food quality and safety of the common octopus *Octopus vulgaris* the fishing port with the common octopus *Octopus vulgaris*, which is available to the consumer in supermarkets, evaluating the possible decrease in quality over time at various stages.

Check if there is a direct link between the contamination of ice used in cooling and contamination present in *Octopus vulgaris*.

The results indicate that the common octopus - *Octopus vulgaris* Peniche traded at auction, as well as the common octopus sold in supermarkets are of high quality.

Keyword: Quality, Octopus, *Octopus vulgaris*, Peniche, Portugal, Degree of freshness

Índice de Figuras

Figura 1. Vista aérea da Península de Peniche (Google Maps, 2012)	1
Figura 2. Ilustração <i>Octopus Vulgaris</i> (FAO, 2012)	7
Figura 3. Refúgio artificial <i>Octopus Vulgaris</i> (Zoomarine, 2009)	7
Figura 4. Distribuição geográfica das populações de <i>Octopus Vulgaris</i> (FAO, 2012)	9
Figura 5. Alcatruzes tradicionais de barro (Náutico, 2010)	9
Figura 6. Artes de pesca – covos (Náutico, 2010)	10
Figura 7. Ilustração da pesca com recurso a alcatruzes (Náutica, 2010)	10

Índice de Quadros

Quadro 1. Condições de desenvolvimento de bactérias indígenas e não indígenas.....	5
Quadro 2. Evolução mundial do <i>Octopus Vulgaris</i> capturado, em toneladas (FAO, 2012.....	8
Quadro 3. Categorias de frescura para Cefalópodes segundo Regulamento nº 2406/96.....	12
Quadro 4. Categorias de frescura para <i>Octopus Vulgaris</i> segundo Vaz-Pires, Barbosa, 2004.....	12
Quadro 5. Distribuição das amostras segundo a tipologia da análise/Avaliação.....	18
Quadro 6. Valores de Peso, pH e temperatura do primeiro lote de amostras da lota de Peniche. 1º Lote analisado.....	25
Quadro 7. Valores de Peso, pH e temperatura do segundo lote de amostras da lota de Peniche. 2º Lote analisado.....	25
Quadro 8. Valores de Peso, pH e temperatura do terceiro lote de amostras da lota de Peniche. 3º Lote analisado.....	25
Quadro 9. Contagem de <i>E. coli</i> , 1º lote de amostras da lota de Peniche.....	26
Quadro 10. Contagem de <i>E. coli</i> , 2º lote de amostras da lota de Peniche.....	26
Quadro 11. Contagem de <i>E. coli</i> , 3º lote de amostras da lota de Peniche.....	26
Quadro 12. Contagem de <i>E. coli</i> , 3º lote de amostras da lota de Peniche.....	26
Quadro 13. Avaliação do índice de frescura das amostras provenientes da lota.....	28
Quadro 14. Contagem de <i>E.coli</i> presente no gelo das amostras provenientes da lota.....	28
Quadro 15. Contagem de <i>E.coli</i> presente no gelo das amostras provenientes da lota.....	29
Quadro 16. Valores de Peso, pH e temperatura do primeiro lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche. 1º Lote analisado.....	29
Quadro 17. Valores de Peso, pH e temperatura do segundo lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche. 2º Lote analisado.....	29
Quadro 18. Valores de Peso, pH e temperatura do terceiro lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche. 3º Lote analisado.....	29
Quadro 19. Contagem de <i>E. coli</i> , 1º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.....	30
Quadro 20. Contagem de <i>E. coli</i> , 2º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.....	30
Quadro 21. Contagem de <i>E. coli</i> , 3º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.....	30

Quadro 22. Contagem de <i>E. coli</i> , 3º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.....	31
Quadro 23. Contagem de <i>E.coli</i> presente no gelo das amostras provenientes da grande distribuição.....	31
Quadro 24. Contagem de <i>E.coli</i> presente no gelo das amostras provenientes da grande distribuição.....	32
Quadro 25. Avaliação do índice de frescura das amostras provenientes da grande distribuição.....	33

Lista de Siglas

ABVT – Azoto Básico Volátil Total

DEV – Caldo lactose pepetona

ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

FAO – Food and Agriculture Organization

LEV – Leuco Violeta Cristal

MKTTn – Caldo tetratiano-novobiocina MÜLLER-KAUFFMANN

XLD – Xilose, Lactose e Sacarose

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Quadros	xi
Lista de Siglas	xiv
Índice	xvi
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	5
3. Metodologia	18
4. Discussão e Resultados	25
5. Conclusão	35
6. Bibliografia	39

1. Introdução

A península de Peniche é uma cidade portuguesa do distrito de Leiria com cerca de 14 700 habitantes, onde durante vários anos da sua história a principal ocupação da população foi a pesca (Calado, M., 1962).

Figura 1. Vista aérea da Península de Peniche (Google Maps, 2012)



Contemplado nos 45 portos registados nas capitánias e delegações marítimas, 32 situados no Continente, 11 na Região Autónoma dos Açores e 2 na Região Autónoma da Madeira, o porto de pesca de Peniche, situado na costa sul da península é um dos principais portos de pesca de Portugal (Portugal Perfil País, 2012).

O polvo a par com a sardinha são as duas espécies de pescado preferidas dos portugueses que consomem cerca de 57 quilos de pescado por ano *per capita*, mais do dobro da média europeia, 21,5Kg, um consumo que obriga a importar dois terços do pescado consumido a nível nacional (TSF, 2012).

Em Portugal, o polvo, a sardinha, o atum, o peixe-espada preto e o bacalhau são as espécies de pescado mais consumidas (TSF, 2012).

Nos últimos anos, o polvo já muito cobiçado ao nível nacional, despertou um elevado interesse internacional, visto ser cada vez mais utilizado na alimentação diária e festiva de vários países (Cunha & Moreno, 1994).

A crescente procura internacional aumentou a sua importância económica que se pode verificar pelo aumento no volume de capturas/descargas em lota na primeira venda (Cunha & Moreno, 1994).

O surgir de inúmeros produtos derivados de polvo com um crescente valor económico como, por exemplo, congelados, refrigerados assim como refeições preparadas/rápidas asseguram o interesse comercial da espécie ao nível nacional e internacional.

Na maioria das lotas a nível nacional o polvo - comum encontra-se entre as 5 espécies mais descarregadas para primeira venda, apesar de não ser a espécie mais consumida a nível nacional é a espécie que apresenta um valor comercial superior na primeira venda, polvo - comum 40,5 milhões de euros seguindo-se a sardinha e o carapau com um valor de 37,4 milhões de euros e 19,7 milhões de euros respetivamente, valores referentes ao ano de 2011 (Docapesca, 2012).

Devido ao seu pH próximo de neutro, à elevada actividade da água (aw) nos seus tecidos e grande disponibilidade de nutrientes, os cefalópodes em fresco são altamente susceptíveis à deterioração.

Adicionalmente os métodos de captura podem provocar um notório stress que potencia a perda de qualidade alimentar. Finalmente os inúmeros microrganismos presentes nas águas e os naturalmente presentes nos cefalópodes têm um papel importante na deterioração dos mesmos, sendo de especial importância a prevenção e controlo dos referidos processos.

Tendo em consideração o aumento do consumo nacional de pescado, assim como a valorização do polvo - comum na primeira venda e a crescente preocupação da população referente à segurança alimentar existe a necessidade de elaboração de investigação científica em torno da qualidade e segurança alimentar do pescado neste caso em concreto o polvo - comum visto a existência deste tipo de estudos ser ainda reduzida a nível nacional.

Dada a importância relativa nos desembarques nacionais e em especial no porto de Peniche, a espécie escolhida para controlo irá ser o *Octopus Vulgaris*, vulgarmente designado por polvo - comum.

Devido à crescente poluição das águas pretende-se verificar se existe uma relação directa entre a contaminação das mesmas e a espécie anteriormente referida.

Devido à crescente exigência por parte dos consumidores e também ao nível legislativo é essencial assegurar a qualidade e segurança alimentar dos produtos “frescos”. Actualmente os produtos “frescos” percorrem longas distâncias até chegarem à mesa dos consumidores portanto é essencial o controlo da qualidade e segurança alimentar deste tipo de produtos a quando da venda ao consumidor final, assim como entre as fases de transacção captura, primeira venda (venda em lota) e venda nas grandes superfícies comerciais.

A avaliação da qualidade e segurança alimentar do polvo especificamente da zona de Peniche (primeira venda – venda em lota) será efectuada com recurso a técnicas microbiologia, físico-químicas e sensoriais.

2. Revisão da literatura

O número de doenças transmitidas por alimentos não é conhecido, sendo várias as razões que contribuem para tal facto. Um dos principais motivos é o facto de em muito países, as doenças provocadas pela ingestão de alimentos não serem de relato obrigatório às autoridades de saúde pública, contudo o pescado é o alimento mais frequentemente associado à ocorrência de doenças de origem alimentar (Huss, H.H.,1997).

Os agentes responsáveis pelas doenças que o consumo de pescado provoca nos consumidores são as bactérias patogénicas seguindo-se os vírus e por fim os parasitas.

As bactérias que afectam a qualidade do pescado dividem-se em indígenas e não-indígenas. As bactérias indígenas são frequentes e encontram-se amplamente distribuídas nos ambientes aquáticos de várias partes do mundo. A temperatura da água tem, naturalmente, um efeito selectivo, sendo que as não indígenas derivam muitas vezes de contaminações provenientes de más práticas de higiene e/ou fabrico (Huss, H.H.,1997).

Quadro 1. Condições de desenvolvimento de bactérias indígenas e não indígenas do pescado (Huss, H.H., 1997).

Bactérias patogénicas	Temperatura mínima – óptima (°C)	Temperatura óptima (°C)	pH mínimo	a _w mínimo	% Sal máximo
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30-37	5,0	0,92	10
<i>Salmonella</i>	5 - 37	45 - 47	4,0	0,94	4 -5
<i>E. coli</i>	5 - 37	44 - 48	4,4	0,95	6

Apesar das preocupações crescentes com as condições de higiene, estas muitas vezes não são respeitadas surgindo a necessidade de estudar a qualidade do pescado em Portugal.

São conhecidos dois subgrupos de cefalópodes, os que possuem oito tentáculos todos iguais sendo designados como *octopodes* e os que apresentam oito tentáculos iguais e dois maiores, os chamados *decápodes*. O polvo – comum encontra-se inserido no primeiro grupo.

Octopus Vulgaris é comumente conhecido como polvo – comum, polvo – da – rocha, poldra, poldro ou polvo – vulgar conforme as variações geográficas (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Esta espécie é facilmente identificável pelo formato do corpo, tendendo este para um formato esférico sendo claramente separado da cabeça por uma chanfradura. Possui oito tentáculos longos, percorridos por duas fiadas de ventosas. Os exemplares desta espécie situam o seu comprimento entre os 30 a 80cm, tendo sido observados espécimes com 130cm (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Os indivíduos desta espécie de polvo podem atingir um peso igual ou superior a 10Kg e um comprimento superior a 1,5m em cativeiro (Rodrigues-Rua, Pozuelo, Prado, Gómez & Bruzón, 2005).

A carne desta espécie apresenta-se dura e de difícil digestão, contudo é uma carne muito saborosa, sendo muito apreciada em vários países, em Portugal destacam-se um pouco por todo o país pratos regionais típicos como arroz de polvo ou saladas frias.

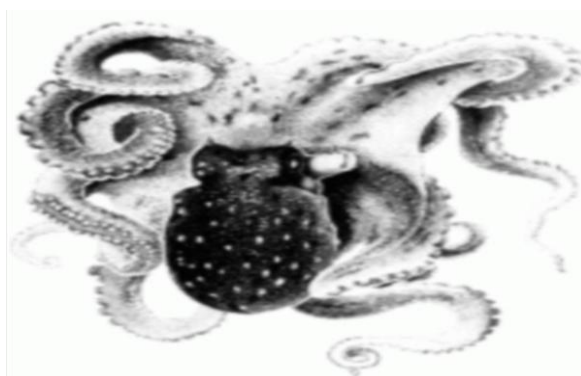
O preço de venda permanece equiparado ao preço dos búzios, sendo o peso mínimo para venda de 750g (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Observações realizadas em laboratório permitem obter respostas sobre o comportamento, alimentação, reprodução, desenvolvimento, crescimento e doenças parasitárias (Nixon, 1969; Iglesias, Sánchez, Otero & Moxica, 2000).

O polvo – comum apresenta-se como uma espécie carnívora ao longo de todo o seu ciclo de vida, tendo como principal dieta o consumo de caranguejos, bivalves e algumas espécies de pescado (Gonçalves & Martins, 1996).

Possui uma boca com maxila semelhante a bico de papagaio e dois olhos posicionados de cada lado da cabeça (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Figura 2. Ilustração *Octopus Vulgaris* (FAO, 2012)



Na costa Algarvia 80% da dieta do polvo – comum é feita à base de bivalves (Chase & Wells, 1986). Hanlon & Messenger (1996), observaram diferenças na dieta da espécie conforme variações geográficas.

Na reprodução, o polvo utiliza refúgios como buracos em rochas ou até mesmo buracos que escavam e fortificam utilizando conchas de bivalves garantindo assim a segurança de mais de 500 000 ovos por fêmea desta espécie. (Pereira, Lourenço, Costa & Ruano, 2006). O período de incubação dos ovos varia conforme a temperatura da água.

Figura 3. Refúgio artificial *Octopus Vulgaris* (Zoomarine, 2009)



Alterações ambientais como temperatura e disponibilidade de alimento afectam directamente o ritmo de crescimento entre indivíduos da mesma espécie e idade (González, Castro & Pascual, 1996).

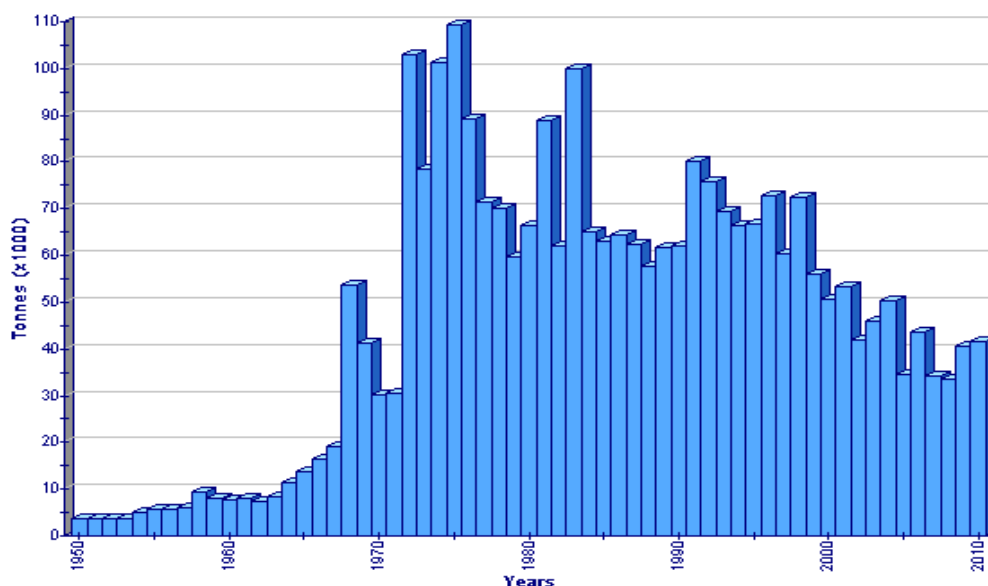
Os cefalópodes, onde se inclui o polvo – comum, fazem parte da alimentação diária de muitos predadores como mamíferos marinhos, aves marinha, algumas espécies de pescado e o Homem (Hanlon & Messenger, 1996).

Quando atinge a idade adulta, o polvo – comum apresenta apenas um predador relevante, o Homem, devido a características da espécie como capacidade de camuflagem, libertação de jactos de tinta (sépia) para dissuadir os seus predadores e a capacidade de sobrevivência à privação de oxigénio ajudam à sobrevivência da espécie (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Os indivíduos adultos possuem ainda a capacidade de sobreviver na ausência de alimentos, metabolizando as próprias proteínas (Pereira, Lourenço, Costa & Ruano, 2004).

Para além da predação natural, a que a espécie está sujeita, surgem outros factores como os microbiológicos ou parasitários que colocam em causa o natural crescimento da espécie. Sendo a infecção bacteriana secundária o principal factor de mortalidade (Sardella & Re, 1988; Hochberg, 1990).

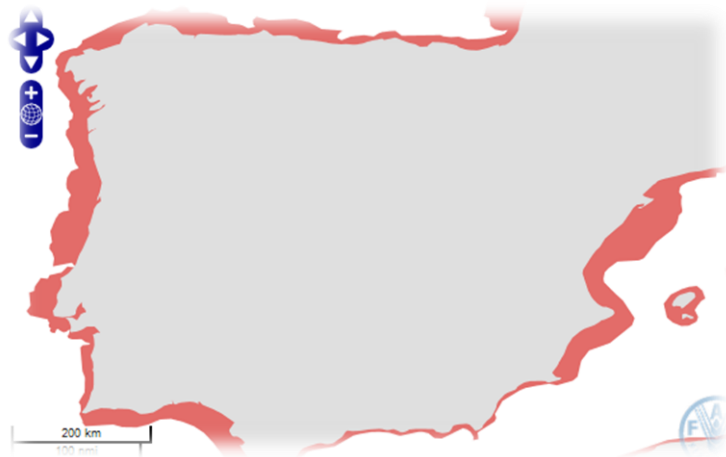
Quadro 2. Evolução mundial do *Octopus Vulgaris* capturado em toneladas (FAO, 2012)



O polvo – comum habita vários tipos de águas de tropicais a temperadas, grandes concentrações de população encontram-se na plataforma continental a 100 – 150 m de profundidade em variados tipos de solos (Mangold-Wirz, 1963; Mangold & Boletzky, 1973; Guerra, 1979; Guerra, 1981).

Na costa continental portuguesa o polvo – comum habita a cerca de 100m da faixa costeira (Caverivière, 2002).

Figura 4. Distribuição geográfica das populações de *Octopus Vulgaris* (FAO, 2012)



O polvo – comum é uma espécie muito frequente em águas continentais e ilhas, abrigando-se nas anfractuosidades das rochas onde os pescadores profissionais e pescadores desportivos, os capturam com o chamado bicheiro de pau com ferro cilíndrico, terminado em curva aguçada, sendo este método de captura utilizado correntemente na pesca desportiva. As artes de pesca utilizadas recorrentemente para a captura desta espécie são os alcatruzes e os covos (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Os alcatruzes são a arte de pesca fixa mais utilizada na região Algarvia (Bernardo, F., Martins, H., 1997).

Os alcatruzes consistem em recipiente de forma cilíndrica feitos de barro ou mais recentemente de plástico.

Figura 5. Alcatruzes tradicionais de barro (Náutico, 2010)



Estudos realizados demonstram que não existe uma preferência da espécie por alcatruzes de barro ou plástico (Borges, Olim, Conde, Calixto & Sendão, 2005).

Por covos entende-se qualquer método de pesca que utiliza estruturas que permitam recolocção essencialmente compostas por uma bolsa, que pode ser prolongada para os lados (Decreto Regulamentar n.º7/2000, de 30 Maio).

Figura 6. Artes de pesca – covos (Náutico, 2010)



Por pesca de armadilha de gaiola entende-se aquela em que se recorre a dispositivo de dimensões e forma muito diversas, constituído por estrutura rígida tal que por si só ou servindo de suporte a pano de rede, delimitam um compartimento cujo acesso é feito através de uma ou mais aberturas fáceis, mas cuja utilização, em sentido contrário, é dificultada às presas. Na pesca do polvo é permitida malhagem de 8 a 29 mm desde que sejam utilizadas armadilhas em arame, designadas por boscas, com diâmetro máximo de 40 cm e altura máxima de 20 cm, ou as armadilhas utilizadas tenham forma de um paralelepípedo ou cilindro com um comprimento máximo de 50 cm e uma altura máxima de 40 cm e disponham de uma abertura superior com um diâmetro mínimo de 12,5 cm. Estas últimas não podem ser utilizadas nos meses de Fevereiro a Julho (Portaria n.º 447/2009, de 28 de Abril).

Figura 7. Ilustração da pesca com recurso a alcatruzes (Náutica, 2010)



Os iscos geralmente utilizados nos covos para a captura do polvo – comum são a cavala e a sardinha.

O polvo comum ao contrário de outras espécies marinhas, sofre uma degradação microbiana mais lenta, apenas foram verificados valores 10^6 ufc/g ao décimo sexto dia de armazenamento (Hurtado, Montero & Borderías, 2001).

Os cefalópodes, neste caso o polvo – comum sofrem uma degradação diferente de outras espécies de pescado, pois possuem uma diferente composição nutricional, uma pele fina e frágil, sendo o seu *rigor mortis* mais curto e de aparecimento rápido (Vaz-Pires & Barbosa, 2004).

Devido ao seu elevado conteúdo em enzimas endógenas e bacterianas, aquando da sua morte o polvo – comum sofre uma rápida degradação proteica, sendo estas responsáveis pela rápida degradação que se verifica na espécie (Hurtado, Borderías, Montero & An, 1999).

As principais mudanças na estrutura e na composição química dos tecidos do pescado podem ser observadas através de mudanças nas propriedades sensoriais, como aparência externa, firmeza consistência da carne e odor, que conjugados com testes químicos permitem saber se o pescado é passível de entrar na cadeia alimentar para consumo humano ou não.

Na União Europeia a avaliação do grau de frescura de pescado baseia-se no estipulado no Regulamento nº 2406/96. Neste Regulamento existem três categorias de frescura, Extra, A e B. A categoria C é considerada imprópria para consumo humano, devendo todo o pescado classificado com esta categoria ser rejeitado – Quadro 4.

Contudo verificou-se que os critérios utilizados para cefalópodes são insuficientes para classificar o grau de frescura do polvo uma vez que possuíam como base o choco. Têm no entanto sido desenvolvidos novos estudos com o intuito de eliminar as falhas existentes, o Quadro 4 é um dos exemplos desenvolvidos por Vaz-Pires, Barbosa, 2004.

Quadro 3. Categorias de frescura para Cefalópodes segundo Regulamento nº 2406/96.

Categoria de Frescura			
Critério	Extra	A	B
Pele	Pigmentação viva, pele aderente à carne	Pigmentação baça; pele aderente à carne	Descolorada; facilmente separada da carne
Carne	Muito firme; branca nacarada	Firme; branco de cal	Ligeiramente mole; branco rosado ou a amarelecer ligeiramente
Tentáculos	Resistentes ao arranque	Resistentes ao arranque	Mais fáceis de arrancar
Cheiro	Fresco; a algas marinhas	Fraco ou nulo	Cheiro a tinta

Quadro 4. Categorias de frescura para *Octopus Vulgaris* segundo Vaz-Pires, Barbosa, 2004.

Categorias de Frescura				
Critério	Extra	A	B	C
Pele	Pigmentação brilhante e uniforme, pele elástica	Pigmentação menos brilhante e uniforme; Aparecimento de coloração ligeiramente alaranjada ou rosa; pele menos elástica	Pigmentação ligeiramente baça, pele menos elástica	Baça descolorada; rosa, praticamente sem elasticidade
Músculo	Muito firme	Firme	Ligeiramente macio	Macio
Cheiro	Marinho, algas	Ligeiramente marinho, neutro	Ligeiramente metálico	Metálico, fecal, adocicado, ácido, peixe podre

O envenenamento por histamina é uma intoxicação química resultante da ingestão de produtos alimentares que contenham níveis elevados de histamina. Este envenenamento foi designado, historicamente, por envenenamento por escombrídeos devido à sua frequente associação ao pescado.

O envenenamento por histamina é um problema a nível mundial e ocorre em países onde se consome pescado, contendo altos níveis de histamina. É uma doença de carácter benigno, sendo o seu período de incubação é muito curto (desde alguns minutos até algumas horas) e a duração da doença é curta (algumas horas). Os sintomas mais comuns são cutâneos tais como ruborização facial, urticária, edema, mas o tracto gastrointestinal pode ser também afectado (náuseas, vómitos, diarreia) bem como a nível neurológico (dores de cabeça, formigueiro, sensação de queimadura na boca) (Huss, H.H., 1997).

A histamina é uma amina biogénica primária, não volátil, termoestável, e mais frequentemente responsável por intoxicações alimentares.

A histamina é produzida pela descarboxilação da histidina por acção de enzimas bacterianas provenientes de microrganismos tais como *Enterobacteriaceae spp.*, *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Morganella spp.*, *Proteus spp.*, *Hafnia alvei* e *Klebsiella spp.*, sendo os microrganismos mais envolvidos a *Klebsiella pneumoniae*, a *Hafnia alvei* e a *Morganella morganii*. A formação de histamina no pescado é afectada por factores como a contaminação pós-captura, temperaturas de conservação elevadas nas embarcações de pesca, procedimentos de refrigeração inadequados, procedimentos de congelação e descongelação inadequados e processos de conserva impróprios (Lehane, L. *et al.*, 2000).

Quando o pescado é capturado e colocado a bordo, o número de bactérias no peixe aumenta devido à contaminação a que é sujeito a bordo que chega a atingir 10^5 a $10^6/cm^2$.

Após classificação e separação, se for efectuada uma boa lavagem com água do mar, as bactérias são reduzidas para 1/3 a 1/10, comparado ao momento antes da lavagem. Posteriormente, muitas outras fontes de contaminação alteram a microflora original, aumentando a contaminação do pescado até chegar à mesa do consumidor (Ogawa, *et al.* 1999).

Segundo Huidobro, Pastor, Lopez – Caballero & Tejada, 2001 as características de frescura do polvo – comum podem ser afectadas quando estes são lavados com água, uma vez que muitas das propriedades sensoriais são influenciadas pelas lavagens.

O polvo – comum sofre uma degradação diferente de outras espécies marinhas, no polvo – comum a elevada flora microbiana geralmente só surge após 18 dias de armazenamento em refrigeração, enquanto que noutras espécies de pescado após 2 ou 3 dias a flora microbiana é bastante elevada. No polvo – comum a degradação por via enzimática é mais evidente do que a degradação microbiana, o nível de degradação enzimática pode ser verificado através atributos sensoriais (Barbosa e Vaz-Pires, 2004).

Hoje em dia, conhecem-se seis espécies de *Listeria*, mas apenas três espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, estão associadas a doenças no Homem e/ou nos animais. Contudo, os casos no Homem, envolvendo *L. Ivanovii* e *L. seeligeri*, são extremamente raros e apenas se assinalaram quatro ocorrências (Huss, H.H., 1997).

A listeriose é uma infeção que se inicia nos intestinos, mas a dose infecciosa é desconhecida. O período de incubação pode variar entre um dia e várias semanas. As estirpes virulentas são capazes de se multiplicar nos macrófagos e produzir septicémia seguida por infeção de outros órgãos tais como o sistema nervoso central, o coração, e podem invadir os fetos nas mulheres grávidas. Em adultos saudáveis, a listeriose quase nunca se desenvolve para além da fase entérica primária que pode não apresentar sintomas ou ter apenas sintomas ligeiros do tipo gripe. A listeriose apresenta riscos especiais e pode ser letal para fetos, mulheres grávidas, recém-nascidos e pessoas imunodeprimidas (Huss, H.H., 1997).

As *Salmonella* são membros da família *Enterobacteriaceae* e ocorrem em mais de 2000 variedades. Estes organismos mesófilos estão distribuídos geograficamente por todo o mundo, mas ocorrem, principalmente, nos intestinos do Homem e dos animais e em ambientes poluídos com excrementos humanos ou animais. A sobrevivência na água depende de muitos parâmetros tais como factores biológicos (interacção com outras bactérias) e físicos (temperatura). Rhodes e Kator (1988) demonstraram que tanto a *E. coli* como a *Salmonella* spp. se podem multiplicar e sobreviver em ambientes estuarinos durante semanas, enquanto Jiménez *et al.* (1989) apresentaram resultados semelhantes em relação à sobrevivência em ambientes tropicais de água doce.

Os principais sintomas da salmonelose são diarreias, dores abdominais, febre, náuseas, vômitos que ocorrem, geralmente, 12 a 36 horas após a ingestão. Contudo, os sintomas podem variar consideravelmente desde uma doença grave do tipo tifóide até uma infecção assintomática. A doença pode também avançar com complicações mais sérias.

A contaminação dos mariscos com *Salmonella*, devido à sua proliferação em águas poluídas, tem sido um problema em muitas partes do mundo. Num recente trabalho de revisão elaborado por Reilly *et al.* (1992), são apresentados resultados obtidos em camarões tropicais de cultura que, frequentemente, se encontram contaminados com *Salmonella*. No entanto, demonstrou-se também que a presença de *Salmonella* em produtos derivados de camarão de aquacultura é principalmente de origem ambiental e não o resultado de baixos níveis de higiene, de medidas sanitárias insuficientes ou da utilização de estrume de aves como ração.

A maior parte dos relatórios indica que o pescado é um veículo de *Salmonella* muito menos frequente do que outros produtos alimentares e que o peixe e os mariscos são responsáveis apenas por uma pequena percentagem do número total de casos (Huss, H.H., 1997).

A *E. Coli* é o organismo aeróbio mais frequente no tracto digestivo do Homem e dos animais de sangue quente. Em geral, as estirpes de *E. coli* que colonizam o tracto gastrointestinal são comensais inofensivas. Todavia existem estirpes patogénicas.

A *E. coli* pode, sem dúvida, ser isolada de ambientes poluídos por matéria fecal ou esgotos e o organismo pode-se multiplicar e sobreviver durante um longo período nestes ambientes (Rhodes e Kator, 1988; Jiménez *et al.*, 1989). No entanto, foi demonstrado, recentemente, que a *E. coli* pode ser igualmente encontrada em águas tropicais quentes não poluídas, onde pode sobreviver indefinidamente (Hazen, 1988; Fujioka *et al.*, 1988; Toranzos *et al.* 1988).

As estirpes patogénicas da *E. coli* provocam doenças do tubo digestivo que podem variar, em gravidade, desde formas extremamente benignas até formas que podem ser mesmo mortais, dependendo de um certo número de factores tais como o tipo de estirpes patogénicas, a susceptibilidade do paciente e o grau de exposição.

Não há indicação de que o pescado seja uma fonte importante de infecção por *E. coli* (Ahmed, 1991). A maior parte das infecções parece estar relacionada com a contaminação da água ou com o manuseamento do produto alimentar em condições não higiénicas (Huss, H.H., 1997).

3. Metodologia

Para a realização do estudo foram utilizadas no total quarenta amostras de polvo - comum (*Octopus Vulgaris*), sendo que vinte foram recolhidas em superfícies comerciais da zona de Peniche e as restantes na lota de Peniche. Para além de polvo - comum também foram recolhidas quarenta amostras de gelo utilizadas na conservação do polvo – comum, vinte das quais oriundas da grande distribuição local e as restantes da lota de Peniche.

Na avaliação primária (índice de frescura, peso, pH e temperatura interna), todas as amostras foram avaliadas e os dados registados. Para as análises microbiológicas e químicas, todas as amostras foram analisadas, contudo estas seguiram uma distribuição diferente para cada tipo de análise, tal como apresentado na tabela 5.

O período entre a colheita das amostras de polvo e a análise em laboratório foi de cerca de 3 a 5 horas, onde as amostras sempre se mantiveram acondicionadas sendo mantidas em refrigeração durante o tempo de espera e o transporte. As amostras de gelo foram recolhidas para um recipiente próprio, estéril e devidamente acondicionadas em refrigeração. Após a avaliação primária e microbiológica as amostras foram congeladas num congelador doméstico para posterior realização das análises referentes ao teor de histamina.

Quadro 5. Distribuição das amostras segundo a tipologia da análise/Avaliação.

	Avaliação	Análises	Análises
	Sensorial	Microbiológicas	Químicas
Número Total	40	40	40
Número Total de amostras provenientes da lota	20	20	20
Número de amostras provenientes da grande distribuição	20	20	20
Número Total de amostras de gelo	40	40	40

Determinação do pH

Segundo Sanchez-Cascado, S., 2005, a determinação do pH pode ser realizada directamente com um eléctrodo de pH para sólidos numa massa homogénea de músculo de pescado triturado ou através da diluição de uma porção de amostra em água destilada.

O valor do pH das amostras de polvo - comum foi medido com um eléctrodo de pH (WTW Serier pH 720 - pH electrode Sentix 22, Inolab) à temperatura ambiente. Foram homogeneizados (1:10) 5g de amostra de polvo triturado em 50 ml de água desionizada. A determinação do pH foi feita em triplicado para cada amostra. Para além do eléctrodo de pH foi também utilizado para medir o valor do pH directamente no músculo, tiras indicadoras de pH (Macherey-Nygel).

Determinação da presença ou ausência de histamina

Para a determinação da presença de histamina foi empregue um método utilizado pela Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar em que através da utilização de uma solução tampão fosfato (composta por dihidrogenofosfato de potássio e di-sódio hidrogéniofosfatododecahidrato com pH ajustado a 6.8), uma preparação enzimática composta por Peroxidase tipo II e Diamine Oxidase e uma solução corante LEV (formada pelo corante leuco violeta cristal e ácido clorídrico). Das três soluções preparadas foram retirados 1 ml, 0,1 ml e 1 ml, respectivamente e colocados num tubo de ensaio devidamente identificado em duplicado. Posteriormente, após a homogeneização das amostras de pescado, foi mergulhada uma *zaragatoa* em cada amostra e colocada no respectivo tubo de ensaio. Foi realizado um ensaio em branco, cuja *zaragatoa* foi mergulhada em água desionizada, e um ensaio padrão (cuja *zaragatoa* foi mergulhada numa solução padrão de histamina a 100 ppm).

Todos os tubos foram colocados em estufa (Binder) durante 20 minutos a 37°C. A coloração violeta revela a presença de histamina.

Análises microbiológicas

As amostras de gelo foram utilizadas sem sofrer qualquer tipo de diluição ou tratamento.

A partir das amostras de polvo - comum recolhidas foram preparadas para cada uma das amostras uma suspensão mãe, procedendo-se do mesmo modo em todas.

Das amostras presentes nos sacos estéreis, extraíram-se 25g (Srcit Pro SPU, New Jersey, USA) para um saco Stomacher (Seward Medical), com recurso a uma pinça, bisturi e tábua de corte estéreis. Ao saco adicionaram-se 225mL de solução água peptonada tamponada.

As suspensões mãe de todas as amostras foram de seguida homogeneizadas em Stomacher (IUL – Instruments, Barcelona, Espanha).

Escherichia Coli

Para determinar a presença de *E.coli*, procedeu-se do mesmo modo em todas as amostras, o procedimento foi realizado segundo a Norma ISO 11649-2 (2001).

O meio de cultura Tryptone Bile X-glucuronid (TBX; MercK, Darmstadt, Alemanha), foi previamente preparado em Erlenmeyer, com recurso a placa de aquecimento com agitador magnético (Agimatic, Barcelona, Espanha), segundo indicações do fabricante. Posteriormente foi transferido para um frasco de schott e esterilizado em autoclave (AJC, Portugal). Durante a inoculação nas placas de Petri, o meio foi fundido no microondas (LG, China) e estabilizado em banho-maria (PSelect Precisdig, Barcelona, Espanha).

Pipetou-se 1mL de suspensão mãe, preparada como descrito anteriormente, para um tubo de ensaio com 9mL de solução água peptonada tamponada. Do primeiro tubo, diluição 10^{-2} , pipetou-se 1mL da suspensão e colocou-se no segundo tubo já com 9mL de solução água peptonada tamponada, procedeu-se sempre do mesmo modo até se atingir a diluição 10^{-4} , entre cada pipetagem resuspendeu-se (Wigger, Hauser, Alemanha) da suspensão presente nos tubos.

Considerou-se a suspensão mãe como a diluição 10^{-1} . A solução de água peptonada tamponada, assim como todo o material utilizado nesta etapa encontravam-se esterilizados em autoclave (AJC, Portugal).

Efectuadas as diluições, pipetou-se 1mL de cada diluição para as placas de petri, operação efectuada em triplicado. Seguiu-se a incorporação das suspensões em meio Tryptone Bile X-glucuronid (TBX; MercK, Darmstadt, Alemanha) e incubação (Binder APT, Tuttlingen, USA) a 44°C durante 24h. As colónias típicas quando presentes são contáveis após este período de incubação. Confirmou-se a natureza das colónias através dos testes de Oxidase e Kovac's.

***Escherichia Coli* em água**

Para determinar a presença de *E.coli* em água, procedeu-se do mesmo modo em todas as amostras, o procedimento foi realizado segundo a Norma ISO 9308-1 (2000).

O meio de cultura Membrane Lauryl Sulfate Agar (MLSA; MercK, Darmstadt, Alemanha) foi previamente preparado em Erlenmeyer, com recurso a placa de aquecimento com agitador magnético (Agimatic, Barcelona, Espanha), segundo indicações do fabricante. Posteriormente foi transferido para um frasco de schott e esterilizado em autoclave (AJC, Portugal).

As amostras de água não sofreram qualquer tipo de diluição. Após filtração das amostras de água através de membranas de filtração de 0,45µm, estas foram colocadas na superfície das placas contendo Membrane Lauryl Sulfate Agar (MLSA; MercK, Darmstadt, Alemanha).

Seguiu-se a incubação (Binder APT, Tuttlingen, USA) a 37°C durante 24h. As colónias típicas quando presentes são contáveis após este período de incubação, confirmou-se a natureza das colónias através do teste Oxidase e do teste de Kovac's.

Listeria monocytogenes

Para determinar a presença de *L.monocytogenes*, procedeu-se do mesmo modo em todas as amostras, o procedimento foi realizado segundo a Norma ISO 11290-1 (2001).

O meio de cultura PALCAM Agar (PALCAM; MercK, Darmstadt, Alemanha) foi previamente preparado em Erlenmeyer, com recurso a placa de aquecimento com agitador magnético (Agimatic, Barcelona, Espanha), segundo indicações do fabricante. Posteriormente foi transferido para um frasco de shot e esterilizado em autoclave (AJC, Portugal). A quando da inoculação nas placas de petri, o meio foi fundido no microondas (LG, China), e estabilizado em banho-maria (PSelect Precisdig, Barcelona, Espanha).

Pipetou-se 1mL de suspensão mãe, preparada como descrito anteriormente, para um tubo de ensaio com 9mL de solução água peptonada tamponada. Do primeiro tubo, diluição 10^{-2} , pipetou-se 1mL da suspensão e colocou-se no segundo tubo já com 9mL de solução água peptonada tamponada, procedeu-se sempre do mesmo modo até se atingir a diluição 10^{-4} , entre cada pipetagem resuspendeu-se e realizou-se o vortex (Wigger, Hauser, Alemanha) da suspensão presente nos tubos. Durante 1h os tubos de ensaio foram encubados (Binder APT, Tuttlingen, USA) a 20°C.

Considerou-se a suspensão mãe como a diluição 10^{-1} . A solução de água peptonada tamponada, assim como todo o material utilizado nesta etapa encontravam-se esterilizados em autoclave (AJC, Portugal).

Efectuadas as diluições, pipetou-se 0,1mL de cada diluição para as placas de petri, operação efectuada em triplicado. Seguiu-se o espalhamento à superfície das suspensões em meio PALCAM Agar (PALCAM; MercK, Darmstadt, Alemanha) e incubação (Binder APT, Tuttlingen, USA) a 37°C durante 24h. As colónias típicas quando presentes são contáveis após este período de incubação.

Salmonella spp.

Para determinar a presença de *Salmonella spp*, procedeu-se do mesmo modo em todas as amostras, o procedimento foi realizado segundo a Norma ISO 6579 (2002).

Os caldos de cultura MKTTn e RVS (MKTTn;RVS; MercK, Darmstadt, Alemanha) foram previamente preparados em Erlenmeyer, com recurso a placa de aquecimento com agitador magnético (Agimatic, Barcelona, Espanha), segundo indicações do fabricante. Posteriormente foi transferido para um frasco de shot e esterilizado em autoclave (AJC, Portugal), segundo as indicações do fabricante.

Pipetou-se 1mL de suspensão mãe, preparada como descrito anteriormente, para um tubo de ensaio com 9mL de solução água peptonada tamponada. Do primeiro tubo, diluição 10^{-2} , pipetou-se 1mL da suspensão e colocou-se no segundo tubo já com 9mL de solução água peptonada tamponada, procedeu-se sempre do mesmo modo até se atingir a diluição 10^{-4} , entre cada pipetagem resuspendeu-se e realizou-se o vortex (Wigger, Hauser, Alemanha) da suspensão presente nos tubos. Durante 24h os tubos de ensaio foram encubados a 41°C e 37°C respetivamente (Binder APT, Tuttlingen, USA).

Considerou-se a suspensão mãe como a diluição 10^{-1} . A solução de água peptonada tamponada, assim como todo o material utilizado nesta etapa encontravam-se esterilizados em autoclave (AJC, Portugal).

Após incubação efetuou-se riscado em placas com XLD (XLD; MercK, Darmstadt, Alemanha) e agar verde brilhante (Agar verde brilhante; MercK, Darmstadt, Alemanha), durante 24 horas a 37°C (Binder APT, Tuttlingen, USA).

As colónias suspeitas foram transferidas para Nutrient agar (Nutrient agar; MercK, Darmstadt, Alemanha) através de riscado, tendo sido encubadas a 37°C durante 24 horas (Binder APT, Tuttlingen, USA).

Depois de incubadas as colónias suspeitas foram sujeitas a testes bioquímicos, tendo sido efetuado o riscado em Agar Urea (Agar Urea; MercK, Darmstadt, Alemanha) e caldo Voges-Proskauer (Caldo Voges-Proskauer; MercK, Darmstadt, Alemanha) durante 24 horas a 37°C (Binder APT, Tuttlingen, USA).

4. Discussão e Resultados

Amostras provenientes da lota de Peniche

Verificação de Peso, pH e Temperatura

Quadro 6. Valores de Peso, pH e temperatura do primeiro lote de amostras da lota de Peniche. 1º Lote analisado

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Peso (g)	958g	845g	1250g	795g	915g
pH	6,38 – 6,30 – 6,31	6,28 – 6,26 – 6,27	6,09 – 6,10 – 6,12	6,29 – 6,30 – 6,29	6,18 – 6,18 – 6,17
T (°C)	4,3	5,1	3,3	4,1	4,9

Quadro 7. Valores de Peso, pH e temperatura do segundo lote de amostras da lota de Peniche. 2º Lote analisado

	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
Peso (g)	1958g	1200g	1284g	973g	890g
pH	6,01 – 6,00 – 5,99	6,12 – 6,11 – 6,12	6,22 – 6,18 – 6,20	6,07 – 6,07 – 6,10	5,80 – 5,81 – 5,85
T (°C)	3,3	2,1	4,7	2,7	5,3

Quadro 8. Valores de Peso, pH e temperatura do terceiro lote de amostras da lota de Peniche. 3º Lote analisado

	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20
Peso (g)	1327g	1289g	1354g	948	823	1738g	1483g	892g	1625g	1284g
pH	5,70 – 5,68 – 5,68	6,02 – 6,05 – 6,02	5,90 – 5,91 – 5,90	6,15 – 6,16 – 6,15	6,34 – 6,33 – 6,36	6,19 – 6,20 – 6,18	5,87 – 5,89 – 5,86	6,01 – 6,00 – 6,01	5,45 – 5,44 – 5,45	6,23 – 6,21 – 6,22
T (°C)	2,1	3,0	4,1	5,1	3,9	2,3	3,2	2,9	4,1	5,3

Nos quadros 6, 7 e 8 podemos verificar que à saída da lota perto de 50% dos polvos recolhidos se encontram com a temperatura muito próxima do limite dos 5°C, sendo que o limite que surge nos códigos de boas práticas encontra-se entre os 0°C e os 5°C.

O peso das amostras recolhidas entrou-se sempre acima do valor mínimo legislado.

O pH das amostras recolhidas situou-se entre os 5,0 e os 7,0 que segundo Lawire, é o valor normal para esta espécie (Lawire,2005).

Contagem de *E.coli*

Quadro 9. Contagem de *E. coli*, 1º lote de amostras da lota de Peniche.

Diluição	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3			Amostra 4			Amostra 5		
10^{-1}	24	54	33	15	123	13	129	11	121	96	87	49	15	45	27
10^{-2}	0	0	0	4	4	27	41	6	3	6	5	3	0	3	1
10^{-3}	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 10. Contagem de *E. coli*, 2º lote de amostras da lota de Peniche.

Diluição	Amostra 6			Amostra 7			Amostra 8			Amostra 9			Amostra 10		
10^{-1}	25	33	40	20	37	24	220	301	303	30	43	16	20	15	23
10^{-2}	21	25	20	18	20	19	120	220	180	20	21	8	12	7	14
10^{-3}	0	0	0	3	9	9	80	100	100	0	0	0	5	3	6
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	7	0	5	0	0	0	0	0	0

Quadro 11. Contagem de *E. coli*, 3º lote de amostras da lota de Peniche.

Diluição	Amostra 11			Amostra 12			Amostra 13			Amostra 14			Amostra 15		
10^{-1}	15	7	8	0	0	0	23	15	14	6	5	3	7	0	0
10^{-2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 12. Contagem de *E. coli*, 3º lote de amostras da lota de Peniche.

Diluição	Amostra 16			Amostra 17			Amostra 18			Amostra 19			Amostra 20		
10^{-1}	37	21	16	2	6	1	15	13	10	0	0	1	21	14	16
10^{-2}	14	12	7	0	0	0	6	3	3	0	0	0	10	6	9
10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Segundo o Regulamento (CE) nº 1441/2007, número de *E. coli* detetada não coloca em causa a saúde pública, contudo estes valores indicam-nos que devem ser tomadas ações concretas que consigam diminuir ao máximo esta bactéria que nos indica contaminação de

origem fecal, muitas vezes devido a más práticas de higiene. Uma vez que o pH ideal de desenvolvimento da *E.coli* se situa entre 6,0 e 8,0 e o pH do polvo – comum situa-se entre 5,0 e 7,0 é necessário que sejam melhoradas as condições higiénicas de superfícies, equipamento e manipuladores, uma vez que o pH do polvo-comum propicia o desenvolvimento ótimo para a *E.coli*.

Pesquisa de *Salmonella spp.*

Nos três lotes de amostras provenientes da lota de Peniche, onde se efectuou a pesquisa de *Salmonella spp.* os resultados obtidos foram nulos em todas as amostras. Considera-se portanto ausência de *Salmonella spp.* em 25g de produto. Cumprindo-se o estipulado no Regulamento (CE) nº 1441/2007.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Nos três lotes de amostras provenientes da lota de Peniche, onde se efectuou a pesquisa de *Listeria monocytogenes* os resultados obtidos foram nulos em todas as amostras. Considera-se portanto ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g de produto. Cumprindo-se o estipulado no Regulamento (CE) nº 1441/2007.

Histamina

Não se verificou a presença de histamina nas amostras recolhidas, a temperatura de refrigeração a que se encontravam as amostras contribui-o significativamente, para além do facto de a espécie não ser propícia à formação de histamina uma vez que não é rica em histidina.

Índice de Frescura

Quadro 13. Avaliação do índice de frescura das amostras provenientes da lota.

Categoria Amostra	Extra	A	B	C
1	3			
2		2		
3			1	
4	3			
5		2		
6			1	
7	3			
8			1	
9		2		
10		2		
11	3			
12	3			
13	3			
14	3			
15	3			
16	3			
17	3			
18	3			
19		2		
20		2		

O quadro 13 referente ao índice de frescura indica que a totalidade das amostras se encontram próprias para consumo, contudo existe uma relação entre um índice de frescura inferior e o nível de contaminação fecal superior como demonstram as tabelas 9, 10, 11 e 12. Podemos verificar que amostras que apresentam um índice de frescura inferior, revelam um maior nível de contaminação.

Contagem de *E.coli* em gelo

Quadro 14. Contagem de *E.coli* presente no gelo das amostras provenientes da lota.

Diluição	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
	13	15	7	0	20	8	0	15	3	16
10 ⁻¹	11	13	4	1	19	9	0	16	4	20
	10	15	6	0	21	9	0	16	1	18

Quadro 15. Contagem de *E.coli* presente no gelo das amostras provenientes da lota.

Diluição	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20
10 ⁻¹	10	3	0	0	17	6	8	21	3	12
	11	4	0	0	12	3	6	17	4	13
	10	1	0	1	17	4	7	15	1	14

Os valores de *E.coli* detetados no gelo recolhido na lota, quadro 14 e 15 indicam contaminação de origem fecal no gelo utilizado para a refrigeração das amostras. Esta contaminação pode dever-se manipulação incorreta do gelo utilizado ou contaminação das tubagens do equipamento de fabrico de gelo ou tubagens de transporte de água.

Amostras provenientes de superfícies comerciais locais:

Verificação de Peso, pH e Temperatura

Quadro 16. Valores de Peso, pH e temperatura do primeiro lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche. 1º Lote analisado

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Peso (g)	1240g	1120g	1222g	998g	1921g
pH	5,78 – 5,78 – 5,79	6,01 – 6,00 – 6,05	5,87 – 5,88 – 5,87	6,00 – 6,01 – 5,97	5,45 – 5,46 – 5,50
T (°C)	5,1	4,2	6,0	5,0	3,9

Quadro 17. Valores de Peso, pH e temperatura do segundo lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche. 2º Lote analisado

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Peso (g)	1100g	1126g	980g	960g	1400g
pH	6,12 – 6,12 – 6,13	5,98 – 5,97 – 5,90	6,21 – 6,20 – 6,19	5,00 – 5,04 – 5,02	6,50 – 6,51 – 6,48
T (°C)	5,3	5,7	6,7	4,7	2,1

Quadro 18. Valores de Peso, pH e temperatura do terceiro lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche. 3º Lote analisado

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
Peso (g)	1250g	1127g	965g	1348g	1843g	1389g	1223g	961g	995g	1301g
pH	6,00 – 6,02 -6,00	5,52 – 5,54 -5,54	6,10 – 6,11 -6,12	6,03 – 6,04 -6,04	5,89 – 5,87 -5,87	5,97 – 5,98 -5,98	6,07 – 6,08 -6,05	6,11 – 6,10 -6,11	5,95 – 5,96 -5,97	6,13 – 6,14 -6,12
T (°C)	5,3	6,2	6,3	5,9	6,9	4,7	5,1	6,2	5,2	5,9

Assim como nas amostras recolhidas em lota, as amostras recolhidas nas superfícies comerciais apresentam uma média de pH entre 5,0 e 7,0 como mencionado por Lawire. O peso das amostras encontra-se dentro do peso legal.

Verificou-se contudo que as amostras da superfície comercial apresentam temperaturas superiores às temperaturas que se encontram mencionadas nos códigos de boas práticas. Temperaturas elevadas, associadas a um pH próximo do pH ótimo para o desenvolvimento de *E.coli* foram detetadas nas amostras recolhidas na grande distribuição.

Contagem de *E.coli*

Quadro 19. Contagem de *E. coli*, 1º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.

Diluição	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3			Amostra 4			Amostra 5		
10^{-1}	125	147	131	121	125	111	103	111	105	135	133	130	15	45	27
10^{-2}	0	0	0	40	27	41	6	20	3	6	5	3	0	3	1
10^{-3}	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 20. Contagem de *E. coli*, 2º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.

Diluição	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3			Amostra 4			Amostra 5		
10^{-1}	25	33	40	20	37	24	220	301	303	30	43	16	20	15	23
10^{-2}	21	25	20	18	20	19	120	220	180	20	21	8	12	7	14
10^{-3}	0	0	0	3	9	9	80	100	100	0	0	0	5	3	6
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	7	0	5	0	0	0	0	0	0

Quadro 21. Contagem de *E. coli*, 3º lote de amostras da superfície comercial da zona de Peniche.

Diluição	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3			Amostra 4			Amostra 5		
10^{-1}	15	7	8	0	0	0	23	15	14	6	5	3	7	0	0
10^{-2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 22. Contagem de *E. coli*, 3º lote de amostras da lota de Peniche.

Diluição	Amostra 6			Amostra 7			Amostra 8			Amostra 9			Amostra 10		
10^{-1}	37	21	16	2	6	1	15	13	10	0	0	1	21	14	16
10^{-2}	14	12	7	0	0	0	6	3	3	0	0	0	10	6	9
10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ao contrário do esperado devido às superiores temperaturas do polvo-comum nas bancadas de venda da grande distribuição, as amostras apresentaram uma menor quantidade de contaminação de origem fecal. Pressupõem-se portanto que mesmo com temperaturas superiores às registadas em lota, o nível de contaminação na grande distribuição foi inferior devido ao facto de serem indústrias com apertado controlo microbiológico interno, apertadas regras de higiene e elevado respeito pelos códigos de boas práticas existentes.

Pesquisa de *Salmonella spp.*

Nos três lotes de amostras provenientes da lota de Peniche, onde se efectuou a pesquisa de *Salmonella spp.* os resultados obtidos foram nulos em todas as amostras. Considera-se portanto ausência de *Salmonella spp.* em 25g de produto. Cumprindo-se o estipulado no Regulamento (CE) nº 1441/2007.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Nos três lotes de amostras provenientes da lota de Peniche, onde se efectuou a pesquisa de *Listeria monocytogenes* os resultados obtidos foram nulos em todas as amostras. Considera-se portanto ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g de produto. Cumprindo-se o estipulado no Regulamento (CE) nº 1441/2007.

Quadro 23. Contagem de *E.coli* presente no gelo das amostras provenientes da grande distribuição.

Diluição	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
10^{-1}	0	1	0	0	2	2	2	4	0	1
	0	1	1	0	1	2	2	3	0	1
	0	2	1	0	2	2	1	4	1	1

Quadro 24. Contagem de *E.coli* presente no gelo das amostras provenientes da grande distribuição.

Diluição	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20
10 ⁻¹	0	0	1	1	1	1	1	4	1	1
	0	0	0	2	1	1	1	2	2	1
	1	0	1	1	1	2	1	4	2	1

A contaminação de origem fecal no gelo utilizado para refrigeração do polvo-comum recolhido na grande distribuição apresenta-se inferior à contaminação do gelo utilizado em lota, sendo quase nula. Tal facto pode dever-se a uma maior eficiência na higienização do equipamento de produção de gelo, utensílios e outros equipamento, assim como uma manipulação mais eficiente e higiénica do gelo produzido.

Histamina

Assim como nas amostras provenientes de lota, as amostras provenientes da grande distribuição local não apresentam histamina, o que se deve ao facto de um polvo – comum ser resistente às oscilações de temperatura, assim pelo facto de por natureza possuir uma baixa carga microbiana.

Índice de Frescura

Quadro 25. Avaliação do índice de frescura das amostras provenientes da grande distribuição.

Categoria Amostra	Extra	A	B	C
1		2		
2			1	
3			1	
4		2		
5		2		
6		2		
7	3			
8	3			
9	3			
10	3			
11		2		
12	3			
13		2		
14	3			
15		2		
16		2		
17		2		
18			1	
19	3			
20		2		

O quadro 25 referente ao índice de frescura indica que a totalidade das amostras encontram-se próprias para consumo, contudo existe uma relação entre um índice de frescura inferior e o nível de contaminação fecal superior como demonstram os quadros 21, 22, 23 e 24. Como esperado, o índice de frescura nas amostras provenientes da grande distribuição apresenta-se inferior ao das amostras provenientes de lota, pois entre a pesca, venda em lota, distribuição e exposição para venda passaram no mínimo 1 a 2 dias.

5. Conclusão

O polvo-comum analisado, tanto na vertente de lota assim como grande distribuição, apresenta uma excelente qualidade e frescura.

Os valores de pH registados encontram-se dentro do intervalo considerado para a espécie, 5,0 e 7,0. Uma vez que o pH se encontra dentro do espectado conclui-se que este não influenciou directamente o desenvolvimento microbiológico (Lawire, 2005).

Os métodos químicos, físicos e microbiológicos têm sido muito usados e são muito aliciantes pela sua objetividade, mas na sua maioria dos casos são morosos, destrutivos, dispendiosos e nem sempre traduzem as alterações do pescado tal como são percecionadas. Como tal neste estudo recorreu-se a métodos sensoriais, dada a facilidade e rapidez com que podem ser efetuados, acrescendo ainda o facto de os resultados destes métodos serem de fácil entendimento pelas indústrias e consumidores (Nunes *et al.* 2007).

Comprovou-se que o método sensorial utilizado para avaliação do polvo é bastante fiável tendo sido nos polvos classificados com categoria B e C, comercializados na lota de Peniche e grande distribuição local que surgiram índices de contaminação por *E.coli* superiores.

Os níveis de contaminação verificados correspondem essencialmente a contaminação por *E.coli*, bactéria esta que quando presente nos indica contaminação de origem fecal.

As amostras provenientes da recolha em lota apresentam um nível de contaminação por *E.coli* superior às amostras provenientes da grande distribuição. A superior contaminação do gelo proveniente da lota, apresenta aparentemente uma relação direta com o aumento de contaminação em lota. Segundo Neto, M., (2008) a qualidade do gelo influencia directamente o nível de contaminação presente no polvo.

A contaminação por *E.coli* indica-nos uma falha nas regras básicas de higiene que surgem mencionadas nos códigos de boas práticas. Para diminuição deste tipo de contaminação sugere-se a formação dos colaboradores/pescadores em boas práticas de

higiene, a verificação do cumprimento dos planos de higienização de equipamentos e superfícies assim como todas as regras mencionadas nos códigos de boas práticas do sector.

Contaminação por *Salmonella spp.* ou *Listeria monocytogenes* não foi verificada em nenhuma das amostras recolhidas, sendo um fator comprovativo da excelente qualidade que o produto apresenta.

Comparando os resultados microbiológicos obtidos na lota de Peniche e grande distribuição local, com os resultados obtidos por Leonardo, A. (2010) na lota de Cascais pode-se afirmar que em ambas as lotas a contaminação por *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* é inexistente. Contudo a contaminação por *E.coli* foi inexistente na lota de Cascais tendo em Peniche apresentado valores que deixam o alerta para a necessidade de implementação/verificação do cumprimento de regras de boas práticas a curto prazo (Leonardo, A., 2010)

O nível de contaminação verificado não coloca em risco a saúde dos consumidores, uma vez que se encontra abaixo dos valores legislados.

Em estudos futuros recomenda-se o desenvolvimento/experimentação de um método que nos permita obter o nível de ABVT especificamente para o polvo, uma vez que o método atualmente existente é insatisfatório, não aferindo resultados fiáveis, falhando muitas vezes o funcionamento a meio do processo não se obtendo qualquer tipo de resultados durante as análises realizadas. O método utilizado para avaliar o grau de frescura de outras espécies de pescado revelaram-se difíceis de aplicar nos cefalópodes, como por exemplo a determinação do ABVT, pois algumas vias metabólicas são diferentes (Yamanaka, Shiomi & Kikushi 1987; Ohashi, Okamoto, Ozawa & Fujita 1991).

Através das análises qualitativas para verificação da presença/ausência de histamina, concluiu-se que nas amostras recolhidas não existe histamina o que nos ajuda a revelar a frescura do produto. Estes resultados aliados à avaliação de frescura efetuada após captura reforçam a excelente qualidade e frescura do produto em análise.

O método qualitativo para análise de histamina, uma vez que é um método rápido, fiável, de fácil execução e de baixo custo, permite-nos efetuar uma triagem antes de partirmos para a utilização de métodos mais dispendiosos como por exemplo HPLC. Contudo em estudos futuros deverá ser complementado com o método quantitativo HPLC.

Pode-se afirmar que o vulgarmente designado como polvo-comum, apresenta uma elevada resistência à degradação microbiana mesmo em condição de refrigeração muitas vezes deficientes.

Futuramente como complemento aos estudos desenvolvidos nacional e internacionalmente, recomenda-se a elaboração de estudos no âmbito dos níveis de metais pesados que possivelmente possam existir nos tecidos do polvo-comum desembarcado na lota de Peniche, uma vez que esta é uma área com poucos estudos desenvolvidos (Leonardo, A., 2010).

Em estudos futuros deveram ser realizados estudos em simultâneo noutras lotas do país com as mesmas condições de análise, para que se possa concluir se a qualidade do polvo em todo o país é de elevado nível como o concluído neste estudo realizado na lota de Peniche.

6. Bibliografia

Geadá, A., Teixeira A. & Pereira M., (2011). Controlo da Qualidade e Segurança Alimentar no Circuito do Pescado Fresco – Pesca de Arrasto e Artesanal.

Ahmed, F.E., (1991). *Seafood safety*. National Academy Press, Washington D.C., USA.

ASF –ASAE – Associação Sindical dos Funcionários da Autoridade da Segurança Alimentar e Económica. (2009) [Acedido a 15/06/2012, (disponível em: <http://www.asf-asae.pt/2-historial.htm>)]

Bernardo, F., Martins, H., (1997). *O Pescado na Alimentação Portuguesa*. (2.^aed.). Lisboa: Instituto Nacional de Formação Turística.

Borges, T. C., OLim, S., Conde, A., Calixto, P. & Sendão, J., (2001). *A pesca do polvo comum no Algarve: melhoramento de artes de pesca artesanal*. IV Encontro das pescas Universidade do Algarve.

Calado, M., (1962). Peniche na História e na Lenda.

Cunha, M. M. & Moreno, A., (1994). *Octopus vulgaris*: it's potential on the Portuguese coast. *ICES C.M*, 1994/k, 33, 19 pp

Caverivière, A., (2002). Éléments du cycle de vie du poulpe *Octopus vulgaris* des eaux sénégalaises. In: *Le poulpe Octopus vulgaris. Sénégal et côtes nord-ouest africaines*. A. Caverivière, M. Thiam and D. Jouffre (eds.): 105-125. Collection Colloques et Séminaires. IRD Éditions. Paris.

Chase, R. & Wells, M. J., (1986). Chemotactile behaviour in *Octopus*. *J. comp. Physiol. A* 156, 375–381.

Docapesca., (2012) [Acedido a 04/04/2012, (disponível em: www.docapesca.pt)]

Fujioka, R. S., K. Tenno e S. Kansako, (1988). Naturally occurring fecal coliforms and fecal streptococci in Hawaii's freshwater streams. *Toxic Assess.* 3, 613–630.

Guerra, A., (1979). Fitting a von Bertalanffy expressions to *Octopus vulgaris* growth. *Inv. Pesq.* 43, 319-327

Guerra, A., (1981). Spatial distribution pattern *Octopus vulgaris*. *Zoological Journal*, (195), 133-136

Gonzalez, A., Castro, B. & Guerra, A., (1996). Age and growth of the short-finned squid *Illex coindetti* in Galician waters (NW Spain) based on statolith analysis. *ICES Journal Marine Science*, 53

Gonçalves, J. M. & Martins, H. R., (1996). Despojos alimentares encontrados em abrigos de polvo-comum (*Octopus vulgaris*) (Mollusca: Cephalopoda) do Faial (Açores) - Dados preliminares. (Kitchen middens found in the hide-outs of the common octopus (*Octopus vulgaris*). Preliminary analyses. *Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia. Universidade dos Açores*, 22 (Expedição Científica Faial 1993): 6 pp

Google Maps. (2012) [Acedido a 02/05/2012, (disponível em: <http://maps.google.com/>)]

Hanlon, R. T. & Messenger, J. B., (1996). *Cephalopod Behaviour*. Cambridge University Press, 232 pp.

Hazen, T.,(1988). Fecal coliforms as indicators in tropical waters: A review. *Toxic Assess.* 3, 461–477.

Hochberg, F. G., (1990). Diseases of Mollusca Cephalopoda. Diseases caused by protists and metazoans. In: Kinne (ed.) Diseases of marine animals, Vol. 111. *Biologische Anstalt Helgoland*, Hamburg, p 47-20

Huss, H.H., (1995). Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Documento Técnico sobre as Pescas N.º 348. Roma, Itália.

Huss, H.H., (1997). Garantia da qualidade dos produtos da pesca. FAO Documento Técnico sobre as Pescas. N.º 334. Roma, Itália.

Huidobro, A., Pastor, A., Lopez-Caballero, M.E., & Tejada, M., (2001). Washing effect on the quality index method (QIM) developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Food research and technology*, 212, 408-412.

Hurtado, J. L., Montero, P., & Borderias, J., Montero, P., & An, H., (1999). Characterization of proteolytic activity in Octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 469-483.

Iglesias, J., Sánchez F.J., Otero, J.J. & Moxica, C., (2000). Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. *Cah. Opt. Médit.*, 47: 313-321

Jiménez, L., J. Munir, G. G. Toranzos e T. C. Hazen, (1989). Survival and activity of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical fresh water. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 61–69.

Leonardo, A. (2010), *Estudo da qualidade do polvo capturado na baía de Cascais*. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

Lehane, L. e Olley, J. (2000), *Review: Histamine fish poisoning revisited*. *International Journal of Food Microbiology*, 58:1-37.

Mangold, K & Boletzky, S., (1973) New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.* 19, 7-12

Mangold, K., (1983). *Octopus vulgaris*. p. 335-364. In: P.R. Boyle (ed). Cephalopod Life Cycles. Academic Press, London.

Náutico. (2010) [Acedido a 02/05/2012, (disponível em: <http://salvador-nautico.blogspot.com/2010/03/alcatruz-skip-cubo-seau-eimer-hink-kova.html>)]

Neto, M., (2008). Qualidade e inocuidade do polvo nos diferentes elos da sua comercialização. Baixa Santista, Brasil.

Nixon, M., (1969). The lifespan of *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proc. Malac. Soc. Lond.*, 38, 529-540

Nunes, ML, Batista I, Cardoso C (2007). Aplicação do Índice de Qualidade (QIM) na Avaliação da Frescura do Pescado. Publicações Avulsas do Ipimar 15, 7-51.

Ogawa, M. e Maia, E., (1999). Manual de pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado. Vol. 1, Livraria Varela, São Paulo.

OHASHI, E., OKAMOTO, M., OZAWA, A., & FUJITA, T. (1991). Characterization of common squid using several freshness indicators. *Journal of Food Science*, 56, 161-163,174.

Ordóñez, J., Rodriguez, M., Álvarez, L., Sanz, M., Minguillón, G., Perales, L., Cortecero, M. (2005). *Tecnologia de Alimentos – volume 1 Componentes dos Alimentos*. (2.^a ed.). Porto Alegre: Artmed.

Ordóñez, J., Rodriguez, M., Álvarez, L., Sanz, M., Minguillón, G., Perales, L., Cortecero, M. (2005). *Tecnologia de Alimentos – volume 2 Alimentos de origem animais*. (2.^a ed.). Porto Alegre: Artmed.

Pereira, J., Lourenço, H., Costa, P., & Ruano, F., (2006). O polvo comum. Aspectos sobre a sua Biologia, Ecologia, Gestão, Qualidades nutricionais, Toxicidade e potencial para Aquacultura. Jornada científica de 31 de Outubro de 2006, IPIMAR

Portugal Perfil Pais. (2012). [Acedido a 12/05/2012, (disponível em: www.portugalglobal.pt)]

Portaria N.º 447/2009, de 28 de Abril, *Diário da República n.º.82 - Série I*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Regulamento (CE) n.º 1441/2007, da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 322/12.

Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L 338/1.

Rodriguez-Rua, A., Pozuelo, I., Prado, M. A., Gómez, M. J. & Bruzón, M. A. (2005). The gametogenic cycle of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) as observed on the Atlantic coast of Andalusia (south of Spain). *Mar. Biol.* 147:927–933

Rhodes, M. W. e H. Kator, (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2902–2907.

Reilly, P. J. A., D. R. Twiddy e R. S. Fuchs, (1992). *Review of the occurrence of salmonella in cultured tropical shrimp*. FAO Fisheries Circular No. 851. FAO, Rome.

Sánchez-Cascado, S., (2005). Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. Dissertação para obtenção grau de Doutor em Nutrición, Tecnología e Higiene de los Alimentos. Universidade de Barcelona.

Sardella, N. H. (1988) Coccidian parasitosis by the genus *Aggregata* in Patagonian shallow water octopuses I . *Aggregata* sp. in *Octopus tehuelchus* d'orbigny Physis (B Aires) Secc A 46(111):51-60

Toranzos, G. A., C. P. Gerba e H. Hansen, (1988). Enteric viruses and coliphages in Latin America. *Toxic Assess.* 3, 491–510.

TSF. (2012) [Acedido a 13/03/2012, (disponível em: www.tsf.pt)]

Vaz-Pires, P. & Barbosa, A. (2004). *Sensory, microbiological, physical and nutritional properties of iced whole common octopus (Octopus vulgaris)*, *Food control*, 15:161-168.

YAMANAKA, H., SHIOMI, K. & KIKUSHI, T. (1987). Agmatine as a potential index of freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *Journal of Food Science*, 52,936-938.

Zoomarine. (2009) [Acedido a 03/05/2012, (disponível em: <http://zoomarine.blogdrive.com/>)]