



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO DE  
MEXILHÕES *Perna perna* PRÉ-COZIDOS E RESFRIADOS**

**MARIELI DE LIMA**  
*Engenheira de Alimentos*

**Florianópolis/SC  
2010**



**MARIELI DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO DE  
MEXILHÕES *Perna perna* PRÉ-COZIDOS E RESFRIADOS**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

**Florianópolis/SC  
2010**



## **Folha de assinaturas**



*“É graça divina começar bem.  
Graça maior é persistir na caminhada certa,  
manter o ritmo!  
Mas a graça das graças é não desistir  
nunca,  
Podendo ou não, caindo, embora aos  
pedaços, chegar até o fim!*

*(Enviada pela minha mãe, no momento em  
que eu mais precisei de força para seguir em  
frente...)*

***Persistir sempre!***



## AGRADECIMENTOS

Nenhum ser humano realiza nada sozinho. As realizações, sejam elas pequenas ou grandes, são resultantes de persistência e de trabalho em conjunto. O apoio, seja ele profissional ou moral, é de vital importância. Agradecer vai além do simples gesto de gratidão, traz o reconhecimento ao esforço alheio e a satisfação de saber que se pode contar com outras pessoas. Por isso, aqui ficam alguns agradecimentos da minha parte.

À Deus, por ser minha fortaleza nos momentos de fraqueza, a minha esperança nos momentos difíceis e a minha certeza de dias melhores. Por tudo.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do mestrado nessa instituição.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Alcilene Rodrigues Monteiro, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela atenção concedida e pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho.

À colaboradora da secretaria da Pós-graduação Raquel Crestani, pela competência demonstrada no auxílio nas pendências do dia-a-dia, pela simpatia e também pela amizade e incentivo dedicados.

À empresa fornecedora dos mexilhões para este projeto, e em especial à colaboradora Maria Madureira, pela disponibilidade, pela compreensão e colaboração para com os experimentos.

À professora Dr<sup>a</sup>. Renata Dias de Melo Castanho Amboni e à aluna Aureanna Negrão pelo auxílio para a execução das análises de cor.

À professora Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira do Laboratório de Energia e Meio Ambiente (LEMA) por disponibilizar o cromatógrafo e às alunas Suelen Amorim e Maria Carolina Mello pela realização das análises cromatográficas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleide Vieira, por viabilizar as análises microbiológicas dos mexilhões junto ao LABCAL e pelo auxílio na interpretação dos resultados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão, pelo auxílio na realização dos cálculos de tratamento térmico do processo e a interpretação dos resultados.

À Cristiane Fagundes, pelas dicas na interpretação dos dados estatísticos e de cromatografia.

À Carolina Siga e à Franciele Leitempergher, pelo auxílio nas análises de temperatura de cocção do mexilhão.

Aos meus pais, Sérgio e Maria Ignez, pelo amor incondicional, pelo carinho, por estarem presentes mesmo na distância, e, sobretudo, pelos grandes incentivadores que são, e por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã Bárbara, que mesmo a distância, também foi um incentivo.

À minha tia Zaira, pelo grande carinho e pela torcida em todos os momentos.

Aos demais membros da minha família pelo incentivo.

Aos meus grandes amigos e colegas de moradia durante o mestrado Luis Fernando e Luís Carlos, pela amizade de vários anos, pela boa convivência, pelos bons momentos vividos e pelas muitas ideias e discussões profissionais também.

À minha grande amiga Raquel, uma pessoa de coração enorme, pela amizade sincera, pelas palavras de conforto, incentivo e pelas dicas.

Aos amigos do Laboratório de Propriedades Físicas (PROFI), Barbara, Marta, Cristiane, Darlene, Jaqueline, Luiz Gustavo, Vivian, Franciny, Kessiane, Gabriel, Jaqueline Bosse, Cristian, Thacyana, Carolina e Franciele, pela parceria, pela boa convivência em laboratório e pelas contribuições.

Às professoras Edna Regina Amante, Gláucia Maria Falcão e Cleide Rosana Vieira, membros da banca examinadora por sua colaboração na avaliação do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos obstáculos, que serviram como fonte de superação e de amadurecimento e que reforçaram a minha escolha por este caminho.

*Marieli de Lima*

*Aos meus pais, Sérgio e Maria Ignez, e à  
minha irmã Bárbara, pelo amor  
incondicional e confiança em mim  
depositada.*

*Ao Gilson, meu namorado e meu  
companheiro de todas as horas, por todo o  
seu amor, apoio e pelos momentos felizes  
compartilhados no decorrer destes dois anos.*



## RESUMO

A expansão da criação de moluscos e o interesse da indústria em melhorar a qualidade do produto beneficiado para competir no mercado externo, podem ser consolidados com a implantação de medidas que melhorem o processamento e aumentem a vida útil do produto final. A avaliação do processamento e da qualidade do produto são necessários para se estabelecer o que deve ser feito nesse sentido. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de processamento dos mexilhões *Perna perna* em uma indústria de pequeno porte, incluindo os aspectos físico-químicos e microbiológicos do produto ao longo do processo e no produto final, embalados com e sem atmosfera modificada, armazenados a 3°C, durante 25 dias. As determinações da composição centesimal no produto processado foram teor de água, cinzas, proteína, lipídeos e carboidratos. As análises físico-químicas foram pH, umidade, atividade de água e cor. A cromatografia gasosa foi utilizada para avaliar a composição dos gases nas embalagens utilizadas. A contagem microbiana de coliformes a 45°C, Estafilococos coagulase positivo, *Salmonella* sp., micro-organismos psicrófilos, micro-organismos psicrotróficos e *Vibrio* sp foram realizadas na água e no gelo usados no processamento e no mexilhão ao longo das etapas de beneficiamento até o produto final, conforme a RDC 54/2000 e a RDC 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. A avaliação microbiológica ao longo do armazenamento foi realizada nos micro-organismos psicrotróficos, micro-organismos psicrófilos e *Vibrio* sp. O pH e a temperatura dos tanques de lavagem e resfriamento foram quantificadas. A temperatura de cocção realizada na empresa foi monitorada, e com isso, avaliou-se o valor F (esterilização do processo) e comparou-se com o valor F a temperatura de 121 °C para o *Clostridium botulinum*. Os resultados apresentaram teor de 2,06% de cinzas; 13,98% de proteína, 2,16% de lipídeos e 6,4% de carboidratos. O pH diminuiu para ambas as amostras com e sem atmosfera ao longo do período. A umidade e os parâmetros de cor L\*, a\* e b\* não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo. A atividade de água obtida foi de 0,99. A composição gasosa no interior das embalagens apresentou valor semelhante ao ar atmosférico, o que demonstra que há deficiência no processo de envase do produto, onde há escape do gás injetado. As condições microbiológicas da água e do gelo envolvidos no processamento não estão de acordo com a Legislação Brasileira quanto à presença de coliformes nas amostras. Foi detectada a presença de *Vibrio* sp e a reincorporação deste no mexilhão processado antes do envase. A classe dos micro-organismos psicrófilos e dos psicrotróficos, apresentou contagem na ordem de 10<sup>5</sup> UFC/g, valor próximo ao limite para o início da degradação do produto durante o armazenamento. A contagem de coliformes, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp e clostrídio sulfito-redutores no mexilhão no decorrer do processamento estão em conformidade com a Legislação Brasileira. O valor de esterilização F encontrado para o processo foi de 0,24 min a 121 °C para o *Clostridium botulinum*, e uma redução decimal de 1,1, valor menor do que do que o requerido para eliminação de esporos desse micro-organismo no processo (12 reduções). Baseados nos resultados, foram propostas mudanças para o processamento do produto na indústria.

**Palavras-chave:** mexilhão. caracterização físico-química. controle de qualidade. vida útil. atmosfera modificada.



## ABSTRACT

The expansion of molluscs creation and the interest from industry to improve the quality of processed product to compete in the external market can be consolidated with the development of procedures what improve the process and increase the shelf life of the final product. The evaluation of processing and the product quality are necessary to establish what should be done in this sense. The objective was to evaluate the processing conditions of the mussels in a small size industry, including the physical, chemical and microbiological aspects from product throughout the process and the, packaged product, with or without modified atmosphere stored at 3 ° C for 25 days. The determination of composition in the processed product were moisture, ash, protein, fat and carbohydrates. The physico-chemical properties analyzed were pH, moisture, water activity and color.. Gas chromatography was used to assess the composition of gases in gas composition was evaluated in the flexible packaging and tray type. Microbial counts of coliforms at 45 ° C, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* sp., psychrophilic micro-organisms, psychrotrophic micro-organisms and *Vibrio* sp were performed in water and ice used in processing and product during the stages of processing until the final product, according the RDC resolution 12 and the RDC resolution 54/2000 12/2001 of the by ANVISA (National Agency of Sanitary Vigilance). The microbiological evaluation during the storage was performed in the psychrotrophic micro-organisms, micro-organisms and psychrophilic *Vibrio* sp. The pH and temperature of the tanks for washing and cooling were quantified. The cooking temperature was held at the company monitored, and with that, if the F value (process sterilization) was evaluated and compared with 121 ° C F values for the *Clostridium botulinum*. The results presented 2,06% ash; 13,98% protein, 2,16% lipids and 6,4% carbohydrates contents. The pH decreased to both atmospheres, during storage period. The moisture and the color parameters L\*, a\* e b\* not significant effect were observed ( $p \geq 0.05$ ). The water activity obtained was 0.99. The gas composition inside the package presented values similar to atmospheric air, which shows that there is a deficiency in the process of filling the product, where are exhaust of proportion gases injected. The microbiological conditions of water and ice involved in the processing are not according to Brazilian legislation regarding the presence of coliform in the samples. There was the presence of *Vibrio* spp and the reintroduction of mussels processed before filling, and counts of psychrophilic and psychrotrophic, which had become the order of  $10^5$  CFU / g, a value close the onset of degradation product in the storage. The count of coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp and sulfite-reducing Clostridia in the mussel in the course of processing are in accordance with Brazilian law. The F value for sterilization procedure was 0.24 min at 121 ° C for *Clostridium botulinum*, and a decimal reduction of 1.1, a value lower than that required for this microorganism spore elimination in the process (12 cuts). Based on the results, were proposed improvements to current product processing.

**Keywords:** mussels. physicochemical characterization. quality control. shelf-life, modified atmosphere.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Cultivo de mexilhões por estacas ou bouchots (a) por Espinheis ou Longlines (b).....	31
<b>Figura 2</b> - Anatomia externa e interna do mexilhão <i>Perna perna</i> .....	32
<b>Figura 3</b> - Mexilhão macho (branco-leitoso) e mexilhão fêmea (vermelho-alaranjado). .....	32
<b>Figura 4</b> - Processamento genérico de mexilhões .....	37
<b>Figura 5</b> - Debulhe e limpeza dos mexilhões para remoção de sujidades .....	55
<b>Figura 6</b> - Rolo para lavagem e peneiramento dos mexilhões.....	56
<b>Figura 7</b> - Esteira de recebimento das conchas higienizadas .....	56
<b>Figura 8</b> - Higienização das caixas plásticas e acondicionamento .....	56
<b>Figura 9</b> - Tanque de cozimento e mexilhões sendo retirados após o processo .....	57
<b>Figura 10</b> - Tanque de resfriamento e descascamento manual.....	57
<b>Figura 11</b> - Tanque com água e gelo e os mexilhões para pesagem e seleção.....	58
<b>Figura 12</b> - Sistema de envase em embalagens do tipo bandeja de 250 g.....	59
<b>Figura 13</b> - Equipamento de envase para embalagens flexíveis.....	59
<b>Figura 14</b> - Medida de controle para verificar a selagem nas embalagens.....	60
<b>Figura 15</b> - Fluxograma de processamento do mexilhão realizado na indústria.....	61
<b>Figura 16</b> - Composição gasosa de mexilhão acondicionado em embalagens flexíveis e condicionado a 3 °C. ....	78
<b>Figura 17</b> - Perfil da temperatura no cesto e nos mexilhões no decorrer do processo de cocção.....	103
<b>Figura 18</b> - Fluxograma de ação para a solução dos problemas na indústria processadora de mexilhões.....	107
<b>Figura 19</b> - Câmara de vácuo e o recipiente com mexilhões para a técnica de resfriamento a vácuo .....	112



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Espécies de mexilhão mais comuns no Brasil.....	29
<b>Tabela 2</b> - Composição centesimal do mexilhão <i>Perna perna</i> . ....	34
<b>Tabela 3</b> - Processos de degradação microbiana nos alimentos .....	44
<b>Tabela 4</b> - Gêneros bacterianos que contêm espécies/linhagens capazes de crescer em 7 °C ou menos.....	46
<b>Tabela 5</b> - Valores de D e z de esporos de células vegetativas de bactérias, bolores e leveduras.....	53
<b>Tabela 6</b> - Análises microbiológicas no produto final.....	66
<b>Tabela 7</b> - Análises microbiológicas realizadas na água e no mexilhão em processamento .....	66
<b>Tabela 8</b> - Composição centesimal do mexilhão <i>Perna perna</i> cozido e resfriado .....	69
<b>Tabela 9</b> - Médias das triplicatas dos valores de pH e umidade com e sem atmosfera modificada, durante 25 dias. ....	71
<b>Tabela 10</b> - Médias das triplicatas dos valores de atividade de água para macho e fêmeas com e sem atmosfera modificada, durante 25 dias.....	71
<b>Tabela 11</b> - Parâmetros de cromaticidade CIELab para mexilhões machos .....	75
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros de cromaticidade CIELab para mexilhões fêmeas .....	76
<b>Tabela 13</b> - Parâmetros de cromaticidade CIELCh para mexilhões machos .....	77
<b>Tabela 14</b> - Parâmetros de cromaticidade CIELCh para mexilhões fêmeas .....	77
<b>Tabela 15</b> - Variação de cor (□E) para mexilhões machos e fêmeas... ..	77
<b>Tabela 16</b> - Contagens microbianas do tempo inicial para mexilhão <i>Perna perna</i> com injeção de mistura gasosa. ....	81
<b>Tabela 17</b> - Contagem de psicrófilos e psicrotróficos e presença/ausência de <i>Vibrio</i> sp no decorrer do armazenamento dos mexilhões a temperatura de 3 °C .....	83
<b>Tabela 18</b> - Contagem de coliformes, estafilococos coagulase positiva, presença/ausência de <i>Salmonella</i> sp e de clostrídio sulfitorreduzores nas águas do processamento de mexilhão.....	86
<b>Tabela 19</b> - Contagem de psicrotróficos, psicrófilos e <i>Vibrio</i> sp para as águas envolvidas no processamento de mexilhão.....	91
<b>Tabela 20</b> - Contagem de coliformes a 35 °C, estafilococos coagulase positiva, presença/ausência de <i>Salmonella</i> sp e de clostrídio	

	sulfito-redutores e para o mexilhão <i>Perna perna</i> nas diversas etapas de processamento .....	95
<b>Tabela 21</b>	- Micro-organismos psicrotóxicos, micro-organismos psicrófilos e <i>Vibrio</i> sp encontrados para o mexilhão <i>Perna perna</i> nas diversas etapas de processamento.....	98
<b>Tabela 22</b>	- Considerações sobre as condições de comercialização e consumo do mexilhão processado na indústria. ....	101
<b>Tabela 23</b>	- Médias de pH e temperatura das águas envolvidas no processamento do mexilhão .....	102

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ACARPESC	Associação Catarinense de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina
APPCC / HACCP	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
Aw	Atividade de água
BPF/ GMP	Boas Práticas de Fabricação
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
NMP	Número mais provável
NTU	Unidade Nefelométrica de Turbidez
ppm	Partes por milhão (medida de concentração)
UFC	Unidades formadoras de colônia



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
4.1 MEXILHÃO ( <i>Perna Perna</i> ) .....	29
4.1.1 Cadeia Produtiva do Mexilhão Perna perna .....	29
4.1.2 Morfologia e características físico-químicas do mexilhão .....	31
4.2 BENEFICIAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO DO MEXILHÃO .....	35
4.3 MICROBIOLOGIA DOS MOLUSCOS BIVALVES .....	38
4.3.1 Micro-organismos patogênicos .....	39
4.3.2 Micro-organismos deteriorantes .....	43
4.4 ACONDICIONAMENTO DE PRODUTOS SOB ATMOSFERA MODIFICADA .....	48
4.5 PARÂMETROS DE QUALIDADE NO PROCESSAMENTO DE MOLUSCOS .....	50
4.5.1 Água e gelo para consumo humano .....	50
4.6 TRATAMENTO TÉRMICO E A ELIMINAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS .....	52
4.7 APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE QUALIDADE AO PROCESSAMENTO DE MOLUSCOS .....	54
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
5.1 MATÉRIA-PRIMA .....	55
5.2 PROCESSAMENTO DO MEXILHÃO <i>Perna perna</i> .....	55
5.2.1 Acondicionamento sob atmosfera modificada .....	58
5.3 ANÁLISES DO PRODUTO .....	62
5.3.1 Composição centesimal .....	62
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....	63
5.4.1 pH .....	63
5.4.2 Determinação da cor .....	63
5.4.3 Atividade de água ( <i>Aw</i> ) .....	64
5.5 Análise estatística .....	64

5.6 CARACTERIZAÇÃO DE GASES DENTRO DO PRODUTO ENVASADO.....	65
5.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	65
5.7.1 Produto final.....	65
5.8 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO DOS MEXILHÕES.....	66
5.9 ANÁLISES COMPLEMENTARES DA ÁGUA UTILIZADA NO PROCESSAMENTO DE MEXILHÕES E DO TRATAMENTO TÉRMICO.....	67
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
6.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	69
6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	71
6.2.1 pH.....	71
6.2.2 Conteúdo de Umidade.....	73
6.2.3 Atividade de água ( $a_w$ ).....	73
6.2.4 Cor.....	74
6.3 CARACTERIZAÇÃO DE GASES NA EMBALAGEM DO MEXILHÃO PROCESSADO.....	78
6.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	81
6.4.1 Microbiota do mexilhão acondicionado sob atmosfera modificada em embalagem flexível.....	81
6.4.2 Avaliação microbiológica da água de processamento do mexilhão.....	85
6.4.3 Avaliação microbiológica do mexilhão durante as etapas do processamento.....	94
6.5 ANÁLISES COMPLEMENTARES AO PROCESSAMENTO DE MEXILHÃO.....	101
6.5.1 Etapa de cozimento.....	103
<b>7 SUGESTÕES PARA MODIFICAÇÕES NA LINHA DE PROCESSAMENTO DO MEXILHÃO.....</b>	<b>107</b>
7.1 ANÁLISE DO PROCESSO.....	108
7.1.3 Sugestões para cada etapa do processamento dos mexilhões.....	108
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O mexilhão é um molusco bivalve pertencente à família dos Mitilídeos, cujas espécies existentes são comestíveis e possuem valor comercial. Assim, o mexilhão *Perna perna* (L) apresenta-se como destaque entre os moluscos pelo fato de ser a espécie mais conhecida no País e por possuir potencial para a mitilicultura (MARQUES, 1998).

A partir da década de 90, a mitilicultura passou a ser considerada uma atividade econômica no Brasil, em especial no Estado de Santa Catarina, que apresenta elevada produção nesse setor, o que corresponde a 95% da produção nacional e posiciona o Estado como o segundo maior produtor da América Latina, ficando atrás apenas do Chile (DE SOUZA et al., 2009). Segundo a EPAGRI (2009), o Estado produziu cerca de 11.294,78 toneladas de mexilhões na safra 2007-2008, sendo o município de Palhoça responsável por 48,32% da produção estadual. Toda a região de produção corresponde à faixa litorânea entre os municípios de Palhoça e São Francisco do Sul, envolvendo também os municípios de Governador Celso Ramos, Bombinhas, Penha e Florianópolis (ANTONIOLLI, 1999).

O cultivo de mexilhões é uma atividade que surgiu como alternativa de renda, sendo de caráter familiar, cuja expansão é favorecida pelos fatores como baixo custo das instalações, facilidade de manejo e localização dos cultivos no mar (CORDEIRO et al, 2007).

A comercialização dos mexilhões é feita pelo produtor ou por intermediários para mercados, peixarias, restaurantes e consumidores. O consumo do mexilhão sofre o efeito da sazonalidade (sendo maior nos meses de verão do que nos meses de inverno). Porém, a produção se mantém estável durante o ano inteiro. A produção de mexilhões do Estado de Santa Catarina abastece, além do mercado local, mercados como Rio de Janeiro e São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (ANTONIOLLI, 1999; DE SOUZA et al., 2009).

Em geral, o mexilhão no Brasil é comercializado processado na forma de carne refrigerada ou congelada e em outros países, encontra-se também na forma defumada e também enlatada (MARQUES, 1998).

O aspecto microbiológico é fator determinante não apenas na conservação do produto, mas também na segurança alimentar no consumo. A forma artesanal como os mexilhões são manipulados nas comunidades pesqueiras é preocupante devido ao uso inadequado de técnicas de processamento, além das precárias condições higiênico-sanitárias dos locais de manipulação (ANTONIOLLI, 1999). A

intoxicação alimentar causada pelo consumo de mexilhões é decorrente do consumo destes nas condições *in natura* ou ligeiramente cozidos, ou obtidos por um processamento inadequado que não eliminou os microorganismos patogênicos presentes nos mesmos. A contaminação dos mexilhões pode ocorrer devido à presença de *Vibrio* presentes na água de cultivo ou durante a manipulação desde a coleta até o processamento (SUPLICY, 1998). Desta forma, melhorias no processamento bem como critérios de padronização são essenciais para que o produto final tenha assegurado sua inocuidade.

## 2 JUSTIFICATIVA

O mexilhão é um produto disponível no litoral de Santa Catarina e que necessita do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de processamento, visando comercializar um produto com maior qualidade e com valor agregado, o que resultaria em desenvolvimento do setor e movimentação da economia.

Um produto necessita ter boas condições microbiológicas e características sensoriais mantidas ao longo de sua vida útil. Isso só é possível se a matéria-prima for de boa qualidade e que esteja dentro dos padrões de inocuidade desejáveis, e cujo beneficiamento esteja em conformidade com os padrões. Para isso, a observação do processamento atual da indústria é importante para detectar pontos não conformes com os padrões de higiene e inocuidade e definir as condições necessárias para melhorar o processo e o seu produto. A caracterização microbiológica do produto antes e após o processamento permite detectar se existem pontos de contaminação e localizá-los, além de identificar os tipos de micro-organismos presentes no produto e as alterações sobre o alimento.

O aumento do consumo e, por consequência, da produção de moluscos bivalves no Brasil depende de investimento em controle higiênico-sanitário.

Com o processamento regularizado e padronizado, é possível o uso de tecnologias que na área de alimentos possibilitem um aumento no consumo de mexilhão, visto que possibilita o transporte do produto a longas distâncias e assegura sua vida útil por maior tempo, conservando as características originais como odor e sabor esperados. A aplicação de atmosfera modificada em alimentos faz com que o produto seja submetido a uma composição gasosa distinta do ambiente, o que traz como consequência o aumento da vida útil, através da interação dos gases com o alimento. Há interesse por parte da indústria em estabelecer padrões de acondicionamento de produtos marinhos sob atmosfera modificada ativa para aumentar a vida útil dos produtos.

O estudo no Brasil é recente, visto que os dados disponíveis na literatura se referem à caracterização físico-química do mexilhão e poucos relacionados com uso de atmosfera modificada para acondicionamento.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as condições de processamento de moluscos em uma indústria de frutos do mar da região de Florianópolis – SC, através da caracterização físico-química e microbiológica da água de processamento e dos mexilhões pré-cozidos e resfriados, com e sem atmosfera modificada.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características físico-químicas e microbiológicas do mexilhão *Perna perna*, acondicionado sob atmosfera modificada e resfriado a 3 °C.
- Utilizar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para averiguar a vida útil do produto armazenado e comparar com o período estimado pelo fabricante;
- Observar e descrever as etapas de processamento dos mexilhões na indústria em estudo a fim de verificar possíveis irregularidades;
- Realizar análise microbiológica das águas de processamento e do mexilhão em cada etapa do processo;
- Avaliar o sistema de envase da indústria;
- Sugerir alterações nas diversas etapas do processamento, caso estas forem necessárias.



## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 MEXILHÃO (*Perna Perna*)

Os mexilhões são moluscos bivalves marinhos, classificados taxonomicamente como parte do filo *Mollusca*, classe *Bivalvia*, Subclasse *Pteriomorpha*, ordem *Mytiloidea* e família *Mytilidae* (MARQUES, 1998). Os gêneros mais comuns são o *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*. Esses tipos de moluscos vivem fixos aos costões rochosos, na região de variação de marés e início do infralitoral (FERREIRA; MAGALHÃES, 1997; apud SCALICE, 2003). No Brasil, a espécie predominante é a do mexilhão *Perna perna*. O mexilhão *Perna perna* é considerado, do ponto de vista comercial, uma das espécies mais importantes (TAVARES et al, 1998).

A ocorrência do mexilhão na costa brasileira se estende do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. O mexilhão da espécie *Perna perna* é dióico e de água marinha (MARQUES; PEREIRA, 1988 apud TAVARES et al., 1998).

A Tabela 1 apresenta as espécies brasileiras de mexilhão mais comuns:

**Tabela 1** - Espécies de mexilhão mais comuns no Brasil

NOME	ESPÉCIE
mexilhão, marisco	<i>Perna perna</i>
sururu	<i>Mytella falcata</i> (=charruana)
mexilhão da Patagônia	<i>Mytilus edulis platensis</i>
mexilhão dos tolos	<i>Brachidontes solisianus</i>
mexilhão dos tolos	<i>Brachidontes darwinianus</i> (=exustus)

Fonte: Scalice (2003)

#### 4.1.1 Cadeia Produtiva do Mexilhão *Perna perna*

O cultivo de mexilhões é uma atividade que teve início na França, há mais de 700 anos, porém no Brasil essa atividade vem sendo desenvolvida com finalidade comercial apenas nas últimas décadas (TAVARES et al., 1998).

No Estado de Santa Catarina, o cultivo de mexilhões na forma comercial iniciou-se no final da década de 80, com desenvolvimento da

tecnologia de cultivo para as comunidades pesqueiras, realizada pela Universidade Federal de Santa Catarina e órgãos estaduais, como o EPAGRI e ACARPESC (LCMM, 2000 apud SCALICE, 2003).

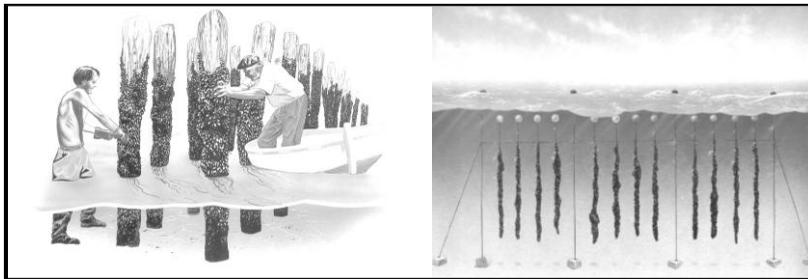
A eficiência do cultivo do mexilhão *Perna perna* é influenciada por diversos fatores, tais como a temperatura, a salinidade, a circulação da água, a densidade dos indivíduos, a quantidade de alimento disponível e a baixa incidência de parasitas, competidores e predadores (GALVÃO et al., 2006).

A produção do mexilhão *Perna perna* tem crescido nas últimas décadas, com uma média de 10 % ao ano. Em relação à produção total da aquicultura, 24 % corresponde à produção de moluscos, onde os mexilhões ocupam 13,3 % dessa produção (SALÁN et al., 2008). A expansão da produção é atribuída ao baixo custo das instalações, à facilidade de manejo e localização dos cultivos no mar (CORDEIRO et al., 2007).

Segundo dados da FAO (2008), a produção global proveniente da aquicultura foi de 27,8 milhões de toneladas em 2006. Para os moluscos, no mesmo ano, a produção foi de 14,1 milhões de toneladas, correspondendo a 27 % da produção total. Isso comprova que a mitilicultura é uma atividade representativa no mundo e que está em expansão.

Segundo Marques (1998), o cultivo de mexilhões, dentro da aquicultura, é considerado o mais lucrativo, devido a fatores como: os mexilhões não necessitam de fornecimento de ração; rápido crescimento, devido ao alto índice de conversão alimentar; o custo das instalações para cultivo é baixa; os mexilhões oferecem facilidade de manejo; o investimento em terras para cultivo é desnecessário, pois o cultivo é levado a cabo do mar; esta modalidade de cultivo animal pode oferecer alta produtividade. A região da Galícia, Espanha, por exemplo, obtém-se produtividade de até 30 toneladas de carne por ano.

Os riscos da mitilicultura, segundo Marques (1998) são: o possível dano ou destruição dos cultivos, devido à condições adversas no mar, como mau tempo e mar agitado e a poluição das águas, que influenciam diretamente nas características microbiológicas do produto. A Figura 1 apresenta dois sistemas de criação do mexilhão *Perna perna*.



**Figura 1** - Cultivo de mexilhões por estacas ou bouchots (a) por Espinheis ou Longlines (b).

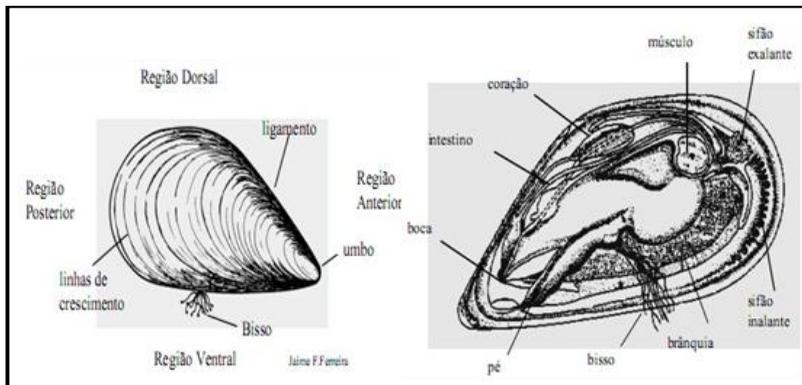
Fonte: CAL (2009).

#### 4.1.2 Morfologia e características físico-químicas do mexilhão

O mexilhão *Perna perna*, assim como outros moluscos, utilizam a filtração da água como meio de alimentação. Esse mecanismo ocorre através do movimento ciliar de células das brânquias, sendo fitoplâncton o principal constituinte da sua dieta (FERREIRA; MAGALHÃES, 1997).

A característica principal é a existência de duas conchas, unidas por um músculo adutor (que controla a abertura e fechamento das valvas), para fins de alimentação e respiração. Os moluscos não possuem região encefálica e olhos (LUDORFF; MEYER, 1973).

As principais estruturas que compõem a anatomia interna do mexilhão são: o manto, as lâminas branquiais, o pé e o bisso. O manto é composto por lâminas epiteliais que formam as cavidades do animal, e servem como abrigo aos outros órgãos, encobrindo-os. A função das lâminas branquiais é de efetuar a respiração, na absorção de oxigênio e seleção das partículas alimentares a serem absorvidas. O pé é usado para a locomoção do mexilhão quando ocorre o desprendimento do animal do substrato (MARQUES, 1998). O bisso tem a função de possibilitar a fixação do mesmo às superfícies. A estrutura é formada por uma substância protéica, secretada por um conjunto de glândulas no interior do pé do mexilhão, que entra em contato com um produto de glândulas de fenol e a própria água do mar, e é polimerizado. O bisso é primeiramente filamentososo, como algas, para depois, ocorrer uma fixação secundária a um substrato rígido (FERREIRA; MAGALHÃES, 1997). A Figura 2 mostra a anatomia interna e externa do mexilhão.



**Figura 2** - Anatomia externa e interna do mexilhão *Perna perna*

Fonte: Ferreira; Magalhães (1997).

A reprodução do mexilhão ocorre por fecundação em ambiente aquático, dos gametas masculino e feminino. O mexilhão é dióico, ou seja, possui sexos separados. No manto estão distribuídos as glândulas sexuais ou folículos, que abrigam os óvulos e os espermatozóides produzidos pelas gônadas. Os gametas conferem ao manto uma coloração característica, sendo branco-leitoso nos machos e laranja-salmão nas fêmeas. A reprodução dos mexilhões ocorre praticamente durante o ano todo, com algumas variações. Os mexilhões da espécie *Perna perna* iniciam sua maturação sexual com dois a três centímetros de comprimento (MARQUES, 1998). A Figura 3 mostra o mexilhão *Perna perna* macho e fêmea, respectivamente.



**Figura 3** - Mexilhão macho (branco-leitoso) e mexilhão fêmea (vermelho-alaranjado).

Fonte: Grupo de Estudos Pesqueiros UNIVALI –Itajaí (2009)

Um mexilhão possui tamanho comercial em torno de 5 a 6 cm (TAVARES et al.,1998). O tamanho final dos mexilhões é consequência de fatores que interferem no seu crescimento, como o ambiente de

cultivo, a temperatura e circulação da água e a densidade de animais em uma área fixa, o que influencia na disponibilidade do alimento ao mexilhão (LCMM, 2000 apud SCALICE, 2003).

A sazonalidade do mexilhão foi estudada e comprovada em diversas pesquisas. Segundo TAVARES et al., (1998), ocorre variação na carne do mexilhão durante o ano devido à composição do fitoplâncton, que serve como alimento, na região de cultivo, o que proporciona alguma diferença no tamanho e também nos valores de sua composição centesimal. O rendimento da carne para mexilhões de cultivo é maior do que de estoques naturais, devido ao fato de que os mexilhões de cultivo estão sempre submersos, tendo assim sua capacidade de respiração e filtração potencializados. Nos estoques naturais, as variações de maré tornam o acesso do mexilhão aos nutrientes inconstante (FERREIRA; MAGALHÃES, 1997). Assim, os animais passam por ausência de alimentação, com conseqüente queda no metabolismo. Isso traz um maior crescimento e rendimento dos mexilhões em cultivo (MARQUES, 1998).

O pH do mexilhão é semelhante aos demais produtos de pescado, com valores em torno de 5 a 7. O mexilhão, como os demais tipos de pescado, é um produto de baixa acidez. Os valores de pH estabelecidos pelo RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - não contemplam especificamente os mexilhões, mas aplicam-se os limites estipulados para pescado, cujo pH para carne externa é de 6,8 e para a interna, inferior a 6,5. Os dados de pH não são suficientes para determinar o frescor, de forma que outras análises complementam as condições físico-químicas do produto (FURLAN et al., 2007). As condições de armazenamento do mexilhão interferem nos valores de pH do produto. A realização de estudos específicos para o pH dos moluscos bivalves é essencial, pois os valores de referência até então utilizados são para pescado, e os mexilhões possuem composição centesimal diversificada, o que pode acarretar decomposição e alteração do pH de forma diferente do pescado (GALVÃO et al., 2006).

O mexilhão é um produto que apresenta uma variação sazonal no que se refere à composição de sua carne. O valor calórico do mexilhão é comparado ao de peixes magros, sendo de 80 kcal/100 g. O carboidrato presente no mexilhão é o glicogênio, que varia de 1 a 7 % de sua composição. O valor protéico médio de mariscos é de 13 % (CORDEIRO et al., 2007). Os mexilhões estão incluídos no grupo do pescado que apresenta baixo valor calórico, além de baixos teores de lipídeos e proteínas. Em compensação, apresenta um teor elevado de

glicogênio (BEIRÃO, 2000 apud CORDEIRO, 2005).

A água é o componente existente em maior proporção na carne de pescado e de moluscos, com valores em torno de 75 a 80 %. Os teores de água elevados potencializam a ação de agentes de deterioração e por isso a participação da água deve ser reduzida como método de conservação. O teor de cinzas em mexilhão é de 1 a 2% (KAI; RUIVO, 1988).

Os mexilhões possuem um valor nutricional excelente, o que torna o produto uma ótima alternativa para o consumo humano. O mexilhão é rico em minerais, como selênio, cálcio, ferro, magnésio, fósforo e vitaminas A, B1, B2, B6, B12 e C. O conteúdo lipídico dos mexilhões é rico em ácidos graxos poliinsaturados, correspondente a 37-48 % dos lipídeos totais. O que contribui para que este produto seja considerado saudável são as proporções das gorduras saturadas, monosaturadas e poliinsaturadas (ORBAN et al., 2002 apud CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008).

Os frutos do mar, como o mexilhão, podem substituir os pratos de entrada com carne gordurosa por uma mistura com vegetais, o que melhora a qualidade da gordura consumida e reduz o valor calórico total ingerido, proporcionando uma mudança no estilo de vida (TRONSDEN et al., 2004).

O valor nutricional do mexilhão, adaptado de Ludorff; Meyer (1973) está apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição centesimal do mexilhão *Perna perna*.

<b>Componente</b>	<b>Valor</b>
Kcal / kJ em 100 g	13/ 53,8
Fração comestível (%)	18
Água (g) 100 g	83
Proteína (g) 100 g	10
Gordura (g) 100 g	1,3
Sais minerais (g) 100 g	1,7

A atividade de água tem sido um parâmetro importante para garantir a estabilidade de alimentos e controlar o crescimento de micro-organismos deterioradores e causadores de intoxicação e infecção alimentar. O controle da água livre nos alimentos visa tornar o alimento estável perante a deterioração microbiana, de forma que os micro-organismos são dependentes da água para seu desenvolvimento.

O valor alto de atividade de água ( $a_w > 0,95$ ) do mexilhão o torna um substrato ideal para os micro-organismos, combinados com a presença de ácidos amino livres, dos níveis de glicogênio e pH alto (6,7 a 7,1) (CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008).

Os pigmentos que compõem a cor final do mexilhão também são dependentes da sua fase gametogênica. A presença de alguns pigmentos nos mexilhões é conhecida há mais de cem anos, como a clorofila, que pode existir nos órgãos, vísceras e gônadas de bivalves (LOUDA et al., 2008). Os carotenóides são pigmentos que prevalecem nas fêmeas, por isso a diferença de coloração em relação aos machos. A cor desses moluscos acaba sendo influenciada pelo metabolismo destes, seja para a reprodução (gametogênese) ou, após sua morte, por reações deteriorantes, decorrentes de ação microbiana (MARQUES, 1998).

## **4.2 BENEFICIAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO DO MEXILHÃO**

Os mexilhões são coletados e transportados ainda vivos, com as valvas fechadas. O primeiro requisito é a procedência de águas limpas e que estejam isentos de micro-organismos patogênicos. Quando os moluscos provêm de regiões arenosas, é recomendável deixá-los em um tanque com água corrente durante o tempo adequado e faz-se a limpeza externa para a remoção de algas e sujidades aderidas (LUDORFF; MEYER, 1973).

A carne das conchas é extraída pela cocção, onde ocorre o enfraquecimento do músculo adutor que mantém a concha fechada. Assim, a temperatura mais alta supera a força que mantém tensos os músculos adutores e as valvas são separadas e a carne pode ser extraída com facilidade. Em alguns casos, a membrana exterior do manto ou os sífões são eliminados, quando os moluscos são oriundos de regiões arenosas e estavam enterrados (LUDORFF; MEYER, 1973). A abertura das valvas não significa o término da cocção, pois a abertura dos bivalves ocorre em seguida ao contato com o calor, o que não é suficiente para a eliminação de micro-organismos (WOOD, 1979).

A cocção além de extrair a carne dos moluscos, serve como o tratamento térmico dado ao produto com a finalidade de reduzir a carga microbiana e inibir o crescimento de bactérias, parasitas e vírus patológicos ao homem. O tempo de exposição ao calor úmido é variável conforme o tamanho, velocidade de penetração do calor e condições de aquecimento (ANTONIOLLI, 1999).

Conforme Silva Júnior (1995), a temperatura ideal no interior do alimento durante a cocção é de 74 °C por 5 minutos ou 65 °C por 10 minutos, considerando as condições mais críticas de contaminação, desde a recepção até o consumo.

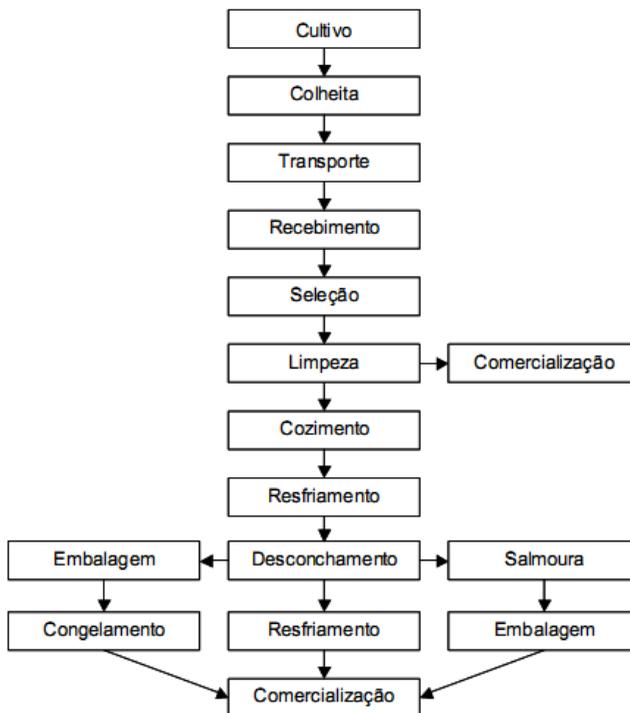
O mexilhão cozido e desconchado é submetido ao resfriamento, para reduzir a velocidade das transformações microbianas e bioquímicas, prolongando sua vida útil. A refrigeração evita o crescimento de diversos grupos de micro-organismos, como os termófilos (35 °C a 55 °C) e mesófilos (10 °C a 40 °C). O grupo capaz de interferir nos alimentos sob refrigeração são os psicrotróficos (-5 °C a 15 °C). O uso de temperaturas mais baixas de refrigeração (abaixo de 5 °C) retarda a alteração microbiana e evita o crescimento de patógenos (FELLOWS, 1994). Dependendo do processo de manipulação, a vida útil de mexilhões refrigerados é de 6 a 7 dias (CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008).

Em países mais desenvolvidos e com histórico mais extenso do cultivo e processamento de mexilhões, como a Espanha, o processamento é realizado de forma padronizada e automatizada. O mexilhão beneficiado na Espanha tem dois destinos principais: o congelamento ou o produto na forma enlatada (NEIRA et al., 1990 apud SCALICE, 2003).

Os mexilhões são adquiridos na forma bruta, sem limpeza prévia ou classificação. A cotação de preços está de acordo com as condições do produto, como a qualidade da carne e a percentagem de detritos que o acompanham. A indústria de conservas da Espanha adota as seguintes etapas para o beneficiamento do mexilhão (NEIRA et al., 1990 apud SCALICE, 2003):

1. desgranação (individualização) e limpeza dos mexilhões;
2. desbarbação (retirada do bisso) e seleção pelo tamanho da concha;
3. cozimento dos mexilhões no vapor (120 °C, durante 2 minutos), permitindo a abertura das conchas;
4. separação entre carne e concha, com o auxílio de uma máquina vibratória e de um banho de salmoura (20% de NaCl);
5. classificação das carnes por tamanho (grande, média ou pequena), e envio destas às fábricas de enlatados.

A Figura 4 ilustra o fluxograma genérico do processamento do mexilhão (HUBER, 2004).



**Figura 4** - Processamento genérico de mexilhões

Fonte: Huber (2004)

A mecanização das diversas etapas padroniza o processo e evita problemas de contaminação cruzada que podem ocorrer em beneficiamentos “artesanais”.

A comercialização do mexilhão *Perna perna* no Brasil ocorre principalmente na forma *in natura*, marinado e congelado, direcionada para estabelecimentos comerciais como bares e restaurantes locais no atacado. Algumas empresas já comercializam mexilhão marinado e temperado, ou pré-cozido acondicionado em embalagens flexíveis. Em outros países, como na Europa, a forma de comercialização de mexilhões é *in natura*, sem casca ou como mexilhões desconchados, refrigerados, embalados em embalagens flexíveis e defumados (RINALDI et al., apud FURLAN et al., 2007; CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008).

Quanto ao consumo, o mexilhão à vinagrete corresponde a 20 % dos pratos preparados com esse molusco (FURLAN et al., 2007).

### 4.3 MICROBIOLOGIA DOS MOLUSCOS BIVALVES

Os moluscos marinhos e bivalves, como os mexilhões, apresentam características microbiológicas, relacionadas com seu *habitat*, sua microbiota natural e a forma como estes são tratados no processamento e conservação. O ponto chave para a qualidade microbiológica está na qualidade sanitária da água de onde os moluscos são retirados. A contaminação microbiana também ocorre em outras etapas, incluindo o processamento, como o desconchamento, resfriamento, entre outros (JAY, 2005).

A necessidade do estudo de micro-organismos que oferecem risco não apenas em relação à intoxicações alimentares, mas também em relação à conservação do produto é necessária, a fim de avaliar a vida útil do produto, evitando a deterioração, que traz como consequência características sensoriais indesejáveis. O estudo dos micro-organismos alvo é capaz de mostrar qual microbiota é mais abundante no produto e com isso, medidas de controle podem ser adotadas.

Os mexilhões podem sofrer a ação de vários micro-organismos, conforme suas condições de processo e armazenamento.

Para o mexilhão *Perna perna*, resfriado, além dos patogênicos, o grupo que oferece maior risco é o dos psicrotróficos, que se desenvolvem em temperaturas de refrigeração. Uma elevada contagem destes acelera as reações de deterioração e compromete o produto.

Os alimentos ricos em proteínas como as carnes e frutos do mar, apresentam degradação mais rápida e evidente, por serem altamente nutritivos, apresentarem alto conteúdo de umidade e pH próximo da neutralidade (HUIS IN'T VELD, 1996).

A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1984) agrupa os indicadores em duas categorias: 1) micro-organismos que não oferecem risco direto à saúde, representados pelos mesófilos, psicrófilos, psicrotróficos e termófilos, além de leveduras; e 2) micro-organismos que oferecem risco baixo ou indireto à saúde, representados pelos coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais e *Escherichia coli*.

A Legislação Brasileira, através da RDC 12/2001, da Agência de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) prevê os seguintes limites para moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados e não, industrializados resfriados ou congelados:

- Coliformes a 45 °C/g: 5 x 10
- Estafilococos coagulase positiva/g: 10<sup>3</sup>
- *Salmonella* sp./25g: Ausência

O *Codex Alimentarius*, através da CAC-RCP 52 (2003), determina que tanto para a água de cultivo quanto para os moluscos frescos, um indicador de contaminação microbiana é necessário, e o mais indicado é a *E. coli* ou coliformes termotolerantes e coliformes a 35 °C (totais) para detectar a presença de contaminação fecal.

#### 4.3.1 Micro-organismos patogênicos

Os moluscos consumidos sem cocção são agentes responsáveis por surtos de febre tifóide e hepatite, tanto nos países do hemisfério norte quanto do sul. A certificação inclui basicamente a *Salmonella* spp. e o *Vibrio parahemolyticus* para adequação aos padrões de qualidade (KAI; RUIVO, 1988).

As bactérias figurantes na Legislação por causar infecções alimentares, ligadas ao consumo de produtos de pescado, são *Salmonella* sp, os coliformes termotolerantes a 45 °C, cujo maior percentual está ligado a *Escherichia coli* e ao *Vibrio parahaemolyticus*, este último próprio do ambiente marinho (VIEIRA, 2003). Outros micro-organismos patogênicos entéricos, a *Shigella* spp., também podem ser veiculadas pelos pescados, além da *Yersinia enterocolitica*, do *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* (KAI; RUIVO, 1988).

##### 4.3.1.1 Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes foram historicamente utilizados como micro-organismos indicadores para servir como uma medida de contaminação fecal, e assim, medir a presença potencial de patógenos entéricos em água fresca (FORSYTHE, 2002). São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, de metabolismo aeróbio ou facultativamente anaeróbio, da família das *Enterobacteriaceae* (VIEIRA, 2003).

A característica principal do grupo dos coliformes totais é a de fermentar a lactose com produção de gás dentro de 48 horas a 35 °C, e é enquanto os coliformes termotolerantes (fecais) fermentam a lactose em temperaturas entre 44,5 a 45,5 °C e são provenientes do trato intestinal (VIEIRA, 2003). O grupo dos coliformes totais é utilizado como indicador da potabilidade da água e como indicador geral das condições higiênico-sanitárias do ambiente de processamento de alimentos (SILVA, CAVALLI; OLIVEIRA, 2006). A determinação de coliformes totais nos moluscos é aplicada como um indicativo das condições

sanitárias e como critério de classificação das águas de cultivo, servindo como um indicador da possibilidade de uma contaminação de origem fecal (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2009).

Os coliformes termotolerantes são considerados indicadores de contaminação fecal por animais de sangue quente e são representados em especial pela *Escherichia coli*, cuja presença corresponde a 90 % da população (VIEIRA, 2003).

A relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos e água com contaminação de origem fecal não é correta, o que levou à necessidade de modificar, na legislação brasileira, a denominação coliformes fecais para coliformes a 45°C, considerando os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalentes a coliformes a 45°C, conforme a Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, (BRASIL, 2001; SILVA, CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

No caso de bivalves, as concentrações de coliformes são provenientes de um processo complexo, que envolve as taxas de filtração, retenção e produção de pseudofeces pelo molusco. A contagem de coliformes no molusco é utilizada como principal indicador da qualidade da água de cultivo e da sanidade desses animais, cuja microbiota é influenciada pelos fatores ambientais (SOLIC et al., 1999; PEREIRA et al., 2009).

A contagem de coliformes termotolerantes de origem fecal continua a ser um padrão de escolha para a análise de frutos do mar e da água na qual esses alimentos são cultivados. A contagem de *E. coli* é utilizada como indicador de contaminação fecal recente ou de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias de processamento de alimentos (SILVA, CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

A sanificação de moluscos e crustáceos é verificada através de testes para coliformes, porém nem sempre eles são considerados bons indicadores de qualidade sanitária, devido ao fato de que algumas águas de cultivo podem ter um bom histórico de qualidade, porém alguns patógenos podem estar presentes nesses animais, como *Vibrio*, além dos coliformes não terem valor na predição da intoxicação escombroides e, em alguns casos, de prever a presença de vírus entéricos (JAY, 2005).

Os limites estabelecidos devem ser discutidos e analisados de acordo com a realidade e com o desejável para o produto. Para moluscos bivalves e crustáceos, a tarefa do estabelecimento de padrões é bastante delicada, devido à deficiência de locais e/ou processos para depuração (KAI; RUIVO, 1988).

#### 4.3.1.2 *Estafilococos* coagulase positivo

O gênero *Staphylococcus* spp é proveniente da microbiota natural das membranas das mucosas do ser humano e de animais (DE BUYSER et al., 1995). São bactérias mesofilicas e a temperatura de crescimento é na faixa de 7,0 a 47,8 °C e considerada ótima entre 30 a 37 °C, enquanto suas enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46 °C (VIEIRA, 2003).

A gastroenterite está associada a ingestão de alimentos contaminados pelo gênero *Staphylococcus* spp devido às toxinas produzidas por esse micro-organismo que são ingeridas junto com o alimento (SIMON; SANJEEV, 2007; VIÇOSA et al., 2010).

O termo coagulase positiva pressupõe a *Staphylococcus aureus*, por esta ser a única bactéria do gênero *Staphylococcus* spp isolada de amostras provenientes de vias humanas. A contaminação dos alimentos pode ocorrer através do homem durante a manipulação, na presença de lesões, espirros, por ser um hospedeiro dessa bactéria (SANDEL; MC KILLIP, 2004; VIEIRA, 2003).

*Staphylococcus aureus* é altamente vulnerável à destruição, tanto por tratamento térmico quanto por agentes de limpeza. Assim, a presença dessa bactéria em alimentos processados ou em equipamentos de processamento é geralmente um indicativo de má higiene (BENNETT, 1984 apud VIEIRA, 2003).

Os frutos do mar recém-capturados estão livres de *S. aureus* e a contaminação por este é resultado da combinação de manipulação imprópria, falta de higiene, armazenamento impróprio ou contaminação cruzada. O crescimento deste micro-organismo é viabilizado em frutos do mar pelo fato destes serem ricos em proteína e por peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (SIMON; SANJEEV, 2007).

A incidência de *S. aureus* em pescado e derivados foi investigada por Sanjeev et al. (1986) apud Simon; Sanjeev (2007) e estes detectaram ser comum a presença deste micro-organismo em uma série de produtos, onde 68 % eram provenientes de produtos de pescado resfriados, 48 % de alimentos prontos para comer, incluindo frutos do mar, 8 % de pescado e frutos do mar, 7% de camarão, 4% de lula e 4 % de pescado.

#### 4.3.1.3 *Salmonella* sp

A *Salmonella* sp é amplamente distribuída na natureza, sendo o principal reservatório destas bactérias o trato intestinal do homem e animais de sangue quente e frio. A exceção está nos peixes, moluscos e

crustáceos, cuja contaminação pode ocorrer após a pesca ou em virtude das águas estarem contaminadas pela bactéria (VIEIRA, 2003).

A penetração de *Salmonella* sp no organismo humano e/ou animal ocorre mediante o consumo de um alimento ou água contaminados (VIEIRA, 2003). A contaminação do alimento ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação inadequadas ou por contaminação cruzada por alimentos crus com alimentos processados. O micro-organismo se multiplica no alimento até atingir a dose infecciosa (FORSYTHE, 2002).

As doenças alimentares causadas por *Salmonella* sp resultam da ingestão de alimentos contendo um número significativo de determinadas linhagens do gênero. Os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos, e consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia. Produtos alimentícios como ovos, frangos, carne e produtos à base de carne são os veículos mais comuns de salmonelose humana (JAY, 2005).

A bactéria *Salmonella* entérica contamina facilmente a fauna em ambientes marinhos, principalmente os moluscos e crustáceos. Por esta razão, ostras e mexilhões estão associados com surtos de salmonelose em todo o mundo (CORRÊA et al., 2007). A incidência deste patógeno entérico em alimentos, em alguns casos, é maior do que 72 %, porém o número de casos reportados ao consumo de pescado e frutos do mar é muito baixo, o que é atribuído ao estresse que a bactéria entérica sofre ao adaptar-se no ambiente marinho (MARTINEZ-URTAZA; LIEBANA, 2005).

A importância da pesquisa de *Salmonella* sp em moluscos bivalves está na freqüente relação desse micro-organismo com gastroenterites e toxinfecções causadas pelo seu consumo cru ou precariamente cozidos (GALVÃO, 2004).

A ocorrência de *Salmonella* sp em frutos do mar pode variar de acordo com a região. Na União Europeia, esta bactéria foi a causa mais frequente de surtos de doenças nos frutos do mar entre 1998 e 2004. Em países asiáticos a ocorrência mais comum é a da *S. weltevreden* (NORHANA et al., 2010).

Todas as bactérias do gênero *Salmonella* sp são destruídas à temperatura equivalente a da pasteurização do leite. Assim, a recomendação para se controlar a *Salmonella* sp é o aquecimento dos alimentos até atingir a temperatura necessária para sua eliminação (65 a 74 °C), além da conservação do produto final em temperaturas inferiores a 5 °C ( JAY, 2005; VIEIRA, 2003).

#### 4.3.1.4 Clostrídios sulfito-redutores

As bactérias relevantes do gênero *Clostridium* no que diz respeito às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são os chamados sulfito redutores, dentre os quais, *Clostridium perfringens*. Outra bactéria sulfito redutora de grande importância é o *Clostridium botulinum*, que se desenvolve em condições de anaerobiose e vários casos de intoxicações devido às toxinas produzidas, principalmente em produtos enlatados (VIEIRA, 2003).

Os clostrídios sulfito-redutores têm sido utilizados como micro-organismos indicadores de contaminação fecal em água, pois sua incidência no meio aquático está relacionada com a presença de dejetos humanos, sendo comum a sua presença em fezes, esgoto e água poluída (GALVÃO, 2004).

A incidência de surtos por *Clostridium perfringens* é raro com pescado e produtos de pescado, embora essas bactérias estejam normalmente presentes em mariscos. Às vezes, tanto o pescado *in natura* quanto o cozido podem estar infectados (GALVÃO, 2004).

As características das intoxicações causadas por *Clostridium perfringens* são dores abdominais, náusea e diarreia aguda, e os alimentos mais envolvidos são as carnes, os produtos cárneos e molhos, que devido ao fato do processo de cocção retirar o oxigênio, proporciona condições adequadas de crescimento de clostrídios, cujos esporos podem persistir após a cocção (FORSYTHE, 2002).

O *Clostridium botulinum* é um micro-organismo conhecido por produzir a toxina que causa o botulismo, doença que pode ser fatal. A presença de esporos do micro-organismos provenientes do ar em latas ou jarras abertas, que depois de fechadas, tem suas condições anaeróbias favorecidas com o crescimento dos esporos e a produção de toxinas. A taxa de fatalidade do botulismo é de 10 % e está associado ao consumo de alimentos enlatados com baixa acidez, vegetais, peixe e produtos de carne (FORSYTHE, 2002). O tratamento térmico de alimentos enlatados de baixa acidez a 121 °C por 3 minutos ou equivalente elimina os esporos de *Clostridium botulinum*, e seu crescimento não ocorre em meios ácidos ou acidificados com pH menores do que 4,6 (FORSYTHE, 2002).

#### 4.3.2 Micro-organismos deteriorantes

Os micro-organismos deteriorantes são aqueles que causam deterioração no produto em virtude do seu metabolismo. Possuem

capacidade proteolítica, pectinolítica e lipolítica (KAI; RUIVO, 1988). A deterioração microbiana durante a distribuição e armazenamento dos alimentos é causada apenas por uma pequena fração de micro-organismos enquanto que nas etapas de colheita, processamento e manipulação a contaminação é maior e mais ampla (HUIS IN'T VELD, 1996).

A Tabela 3 mostra os principais processos de degradação causados pelo crescimento de micro-organismos nos alimentos.

**Tabela 3** - Processos de degradação microbiana nos alimentos

<b>ESTRUTURA QUÍMICA NO ALIMENTO</b>	<b>MICRO-ORGANISMO</b>	<b>PRODUTOS DO METABOLISMO</b>
Elevado teor de carboidratos	Fermentadores de carboidratos	Ácidos + álcoois + gases
Contém proteínas	Proteolíticos	Aminoácidos + aminas + amônia + sulfeto de hidrogênio
Contém gorduras	Lipolíticos	Ácidos graxos + glicerol

Fonte: KAI; RUIVO (1988).

A temperatura ótima de crescimento para a maioria desses micro-organismos está próxima a temperatura ambiente. Outros também se desenvolvem à temperatura de refrigeração (KAI; RUIVO, 1988). Ainda há fatores que interferem no processo de deterioração, como os tipos de micro-organismos contaminadores, da composição química do alimento, da disponibilidade de nutrientes, do armazenamento, do suprimento de oxigênio, do teor de umidade, da concentração osmótica, do pH e da presença de substâncias inibidoras (NOBLE; NAIDOO, 1981).

Em relação aos produtos à base de pescado, os micro-organismos psicrotróficos são o principal grupo de ação deteriorante, destacando-se as bactérias Gram-negativas, que se desenvolvem a baixas temperaturas. A utilização de altas temperaturas no processo de cocção elimina o risco de proliferação dos micro-organismos nos produtos, porém práticas inadequadas podem acarretar a recontaminação dos produtos, o que pode viabilizar o crescimento em baixas temperaturas (HUSS, 1997).

Entre as bactérias responsáveis pela deterioração de pescado resfriado, estão as *Pseudomonas* sp. e *Shewanella putrefaciens*. Em alimentos acondicionados em atmosfera modificada, *Photobacterium phosphoreum* foi responsável por deterioração mesmo em presença de CO<sub>2</sub>, em pescado proveniente de águas tropicais (GRAM; HUSS, 1996). A inocuidade do processo é essencial no combate ao desenvolvimento

dos micro-organismos deteriorantes durante o armazenamento a baixas temperaturas.

Os mecanismos de deterioração nos moluscos diferem dos demais frutos do mar devido à grande quantidade de carboidratos na forma de glicogênio, o que acarreta atividades fermentativas como parte da deterioração microbiana (JAY, 2005).

Franco; Landgraf (2005) relatam alguns micro-organismos predominantes em bivalves durante o processo de deterioração, em diferentes estágios, sendo os seguintes gêneros isolados de ostras deterioradas: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Shewanella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Flavobacterium*. O predomínio dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, *Moraxella* spp ocorre com o avanço do processo deteriorativo. Nos últimos estágios de deterioração, há domínio de enterococos, lactobacilos e leveduras.

#### **4.3.2.1 Micro-organismos psicrófilos**

Os psicrófilos são definidos como micro-organismos adaptados ao frio que se desenvolvem entre 0 °C e 20 °C, com temperatura ótima de crescimento entre 10 e 15 °C (FRANCO & LANDGRAF, 2005; BOURGEOIS et al. (1988) apud FRANÇA FILHO et al. 2006). E, possuem uma amplitude de temperatura de crescimento de -8 °C a 25 °C (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

Os psicrófilos mais conhecidos são capazes de se adaptar e se desenvolver a temperaturas próximas a 0°C, mas têm o seu crescimento ótimo entre 25 e 35°C, o que os aproxima dos mesófilos (BOURGEOIS et al. (1988) apud FRANÇA FILHO et al. 2006).

#### **4.3.2.2 Micro-organismos psicrotróficos**

Um psicrotrófico é um organismo capaz de crescer em temperaturas entre 0 °C a 7 °C e produzir colônias visíveis (ou turbidez) no período de 7 a 10 dias. A amplitude de temperatura dos psicrotróficos é de -5 °C a 40 °C, com a temperatura ótima acima dos 20 °C (Baptista; Venâncio, 2003). Desta forma, os micro-organismos que causam a deterioração de carnes, aves e vegetais no intervalo de 0 °C a 5 °C deveriam ser considerados psicrotróficos (JAY, 2005).

As principais bactérias desses gêneros produzem alterações em carne, ovos e outros alimentos conservados em temperaturas de

refrigeração. O desenvolvimento das bactérias nas temperaturas de refrigeradores domésticos (4,4 °C) é lento.

As espécies e linhagens que podem crescer a/ou abaixo de 7 °C são amplamente distribuídas entre os gêneros de bactérias Gram-negativas e menos entre as Gram-positivas, conforme mostra a Tabela 4, adaptado de JAY (2005).

**Tabela 4** - Gêneros bacterianos que contêm espécies/linhagens capazes de crescer em 7 °C ou menos.

<b>Gram- negativos</b>	<b>Números Relativos</b>	<b>Gram-positivos</b>	<b>Números relativos</b>
<i>Acinetobacter</i>	xx	<i>Bacillus</i>	xx
<i>Aeromonas</i>	xx	<i>Brevibacterium</i>	x
<i>Alcaligenes</i>	x	<i>Brochothrix</i>	xxx
<i>Alteromonas</i>	xx	<i>Carnobacterium</i>	xxx
<i>Cedecea</i>	x	<i>Clostridium</i>	xx
<i>Chromobacterium</i>	x	<i>Corynebacterium</i>	x
<i>Citrobacter</i>	x	<i>Deinococcus</i>	x
<i>Enterobacter</i>	xx	<i>Enterococcus</i>	xxx
<i>Erwinia</i>	xx	<i>Kurthia</i>	x
<i>Escherichia</i>	x	<i>Lactobacillus</i>	xx
<i>Flavobacterium</i>	xx	<i>Lactococcus</i>	xxx
<i>Halobacterium</i>	x	<i>Leuconostoc</i>	x
<i>Hafnia</i>	xx	<i>Listeria</i>	xx
<i>Klebsiela</i>	x	<i>Micrococcus</i>	xx
<i>Moraxella</i>	xx	<i>Pediococcus</i>	x
<i>Morganella</i>	x	<i>Propionibacterium</i>	x
<i>Photobacterium</i>	x	<i>Vagococcus</i>	xx
<i>Pantoea</i>	xx		
<i>Proteus</i>	x		
<i>Providencia</i>	x		
<i>Pseudomonas</i>	xxx		
<i>Psychrobacter</i>	xx		
<i>Salmonella</i>	x		
<i>Serratia</i>	x		
<i>Shewanella</i>	xxx		
<i>Vibrio</i>	xxx		
<i>Yersinia</i>	xx		

x = casos ocorridos; xx = relatos mais frequentes.

Fonte: JAY (2005).

Os psicrotróficos presentes no pescado e frutos do mar são provenientes do ambiente de cultivo, em especial das águas temperadas. Entre os psicrotróficos, as *Pseudomonas* e *Shewanella* dominam a microbiota do alimento depois de 1 a 2 semanas de armazenamento (SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002).

No caso de carnes embaladas na forma aeróbia (atmosfera convencional) o psicrotrófico dominante é a *Pseudomonas* spp, pois são micro-organismos aeróbios restritos e que crescem rapidamente em temperaturas de refrigeração, sendo capazes de dominar a microbiota do produto. O seu crescimento é suprimido com o uso de vácuo ou de atmosfera modificada com concentrações superiores a 20% de CO<sub>2</sub> (HOLLEY; GILL, 2005). Outros micro-organismos que são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração são a *Listeria monocytogenes* a 0 °C, *Clostridium botulinum* a 3 °C, *Salmonella sp* a 6 °C, *Vibrio cholerae* a 5 °C e *Bacillus cereus* a 5 °C (SILVA JR., 1997).

#### 4.3.2.3 *Vibrio sp*

A ocorrência de infecções alimentares relacionadas à algumas espécies de *Vibrio sp* tem ocorrido nos últimos anos. O *Vibrio parahaemolyticus* está relacionado como um enteropatógeno em potencial de distribuição universal, sendo encontrado em alimentos como peixes de água marinha, moluscos e crustáceos, além de águas estuarinas e sedimentos (VIEIRA, 2003).

*Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria Gram-negativa halofílica e que se apresenta na forma de bastonetes curtos. É anaeróbio facultativo e seu crescimento ocorre melhor em pH alcalino entre 7,5 e 8,5 e a temperatura ótima entre 35 e 37 °C, além de se desenvolver em ambientes com presença de sal (VIEIRA, 2003). O nome *Vibrio parahaemolyticus* significa *vibrio* que dissolve o sangue e este não é isolado na ausência de NaCl (2 a 3 %) (FORSYTHE, 2002).

Os sintomas comumente descritos e associados com infecções causadas por *Vibrio parahaemolyticus* são: diarreia, náusea, vômito, cefaleia, febre e calafrios. Os surtos registrados indicam que a causa é o consumo de alimentos de origem marinha crus ou inadequadamente cozidos, ou cozidos e recontaminados (LEE et al, 2008). As infecções por esse microrganismo são mais frequentes nos meses de verão, período com maior distribuição quantitativa no ambiente marinho (ARCHER; MORETTO, 1994).

O micro-organismo está presente em peixes e frutos do mar, de

forma geral, em quantidade inferior a  $10^3$  UFC/g, exceto em águas mornas, onde a contagem pode aumentar para  $10^6$  UFC/g. As principais precauções para evitar doenças causadas por esse micro-organismo é não consumir frutos do mar mal cozidos ou crus, em especial os moluscos bivalves (VIEIRA, 2003).

O *Vibrio alginolyticus* representa um patógeno ubíquo do ambiente aquático, incluso como parte da microbiota saprófita de animais marinhos. A concentração dessa bactéria é maior em períodos quentes do ano, onde atinge concentração suficiente em frutos do mar para causar doenças aos humanos, e esta é uma das espécies mais comuns isoladas de água do mar. (RIPABELLI et al., 2003). A patogenicidade desse micro-organismo é de interesse particular aos profissionais cujas atividades envolvem aquicultura e também a manipulação de alimentos e beneficiamento de pescado, devido às infecções causadas, tendo como principal via de acesso os cortes ou lesões cutâneas expostos ao ambiente marinho (PEREIRA et al., 2007).

A contagem de *Vibrio alginolyticus* em relação a doenças alimentares não é relacionada. A sua presença está associada com a ocorrência de infecções de ouvido e de feridas na pele (RIPABELLI et al., 2003). A infecção vinculada ao consumo de frutos do mar nunca foi relacionada a esse micro-organismo (LHAFI; KÜHNE, 2007). A ocorrência de *Vibrio alginolyticus* não é significativa em espécies específicas de pescado marinho analisadas como camarões ou moluscos bivalves (JAKSIC et al., 2002).

O isolamento de qualquer espécie de *Vibrio* sp a partir de alimentos cozidos indica práticas de higiene inapropriadas, já que essa classe de micro-organismo é rapidamente destruído pelo calor (FORSYTHE, 2002).

#### **4.4 ACONDICIONAMENTO DE PRODUTOS SOB ATMOSFERA MODIFICADA**

O uso da atmosfera modificada em pescado em moluscos está vinculado à conservação dos produtos, mediante uma proporção gasosa diferente do ar atmosférico. O envase de produtos cárneos pré-cozidos em atmosfera modificada é comum no oeste da Europa, contudo são raros os estudos de como ocorrem os mecanismos de solubilidade e de difusão de CO<sub>2</sub> nos alimentos (SIVERTSVIK; JENSEN, 2005).

O oxigênio é o responsável pelas reações de oxidação dos lipídeos, rancidez, perda de gosto e sabor e descoloração, além de

possibilitar o crescimento de micro-organismos aeróbios, nos quais grande parte exercem ação deteriorante e em conjunto com outras reações químicas, viabilizam a deterioração do alimento. Remover o oxigênio do *headspace* é decisivo em prevenir esses problemas e manter o produto fresco por um período maior. Porém deve permanecer na proporção suficiente a fim de evitar o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios. O oxigênio preserva a cor vermelha em carne vermelha e sustenta a respiração dos produtos frescos (NOVAK et al., 2003).

O CO<sub>2</sub> tem um efeito inibitório no crescimento microbiano, principalmente de micro-organismos aeróbios, que são sensíveis ao CO<sub>2</sub>. Por outro lado, atmosferas com 100 % de CO<sub>2</sub> possibilitam o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios, que representam risco para a saúde humana. O CO<sub>2</sub> é altamente solúvel em água e gordura. Sua presença em altas concentrações pode causar colapso da embalagem e gosto ácido, além da formação de ácido carbônico em alimentos. O CO<sub>2</sub> desempenha um papel nas enzimas citoplasmáticas por induzir ou reprimir a síntese de enzimas e taxas de reação enzimáticas. Contudo, nem todas as enzimas são inibidas pelo CO<sub>2</sub>. Em relação ao mecanismo do CO<sub>2</sub> e o metabolismo, CO<sub>2</sub> permeia a membrana e reage com água no citoplasma para formar bicarbonato e íons hidrogênio. Os íons hidrogênio acidificam o interior da célula e o organismo requer energia celular para bombear os prótons de volta. O requerimento adicional de energia cria um estresse celular, que inibe o crescimento (NOVAK et al., 2003).

O nitrogênio é moderadamente solúvel em água e gordura e não exerce efeito intrínseco sobre os micro-organismos. O principal motivo para o seu uso é possibilitar o deslocamento do oxigênio, atuando como um gás inerte resultando em redução de reações oxidativas e inibição de micro-organismos aeróbios. O seu uso também é atribuído por ser um “gás de enchimento”, que fisicamente protege os alimentos na prevenção de colapso da embalagem (NOVAK et al., 2003).

A modificação da atmosfera tem efeito nos produtos à base de pescado por inibir as reações de oxidação e o crescimento bacteriano. O aumento da vida de prateleira vai depender da espécie e também de alguns fatores, como o conteúdo de gordura, a população microbiana inicial, a mistura de gás, a relação volume/gás do produto e da temperatura de armazenamento (SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002 apud CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008).

Os principais problemas nos produtos pesqueiros são de origem bacteriológica. Por essa razão, a concentração mínima e máxima de CO<sub>2</sub>

deve ser estabelecida. Paralelamente, o oxigênio residual precisa ser controlado para garantir a eficácia do sistema da embalagem. A vida útil para esses produtos pode ser aumentada de 50 % a 200 % acima do normal em condições idênticas de temperatura e estocagem (KAI: RUIVO, 1988).

O controle microbiano nos mexilhões acondicionados sob atmosfera modificada só é possível perante a correta manipulação dos fatores que envolvem seu desenvolvimento, como atividade de água, temperatura e disponibilidade dos nutrientes, que são dependentes entre si. Outros fatores como pH ou presença de substâncias antimicrobianas naturais ou intencionalmente adicionadas (como as atmosferas modificadas) agem simultaneamente sobre a atividade de água limitante para cada micro-organismo, fazendo com que assim, seja minimizada sua carga microbiana durante e após o processamento (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os estudos na preservação de moluscos com a atmosfera modificada ainda são raros, em especial com mexilhões, de forma que as informações sobre eles são limitadas.

Os gases que compõem a atmosfera modificada são utilizados com o intuito de inibir o crescimento de micro-organismos e assegurar as características iniciais do produto. O uso de concentrações diferentes de gases como CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, combinados com refrigeração adequada, inibe o crescimento de bactérias proteolíticas, micro-organismos aeróbios, fungos e leveduras (CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008).

## **4.5 PARÂMETROS DE QUALIDADE NO PROCESSAMENTO DE MOLUSCOS**

### **4.5.1 Água e gelo para consumo humano**

O *Codex Alimentarius* (2000) apud Kirby et al., (2003) cita que a quantidade de água que deve entrar em contato com o alimento deve ser baixa. No entanto, a qualidade da água deve ser alta e com condições de potabilidade. A água de resfriamento deve possuir qualidade entre média a alta, bem como para produção de gelo. A boa qualidade da água que entra em contato com o alimento é importante para evitar a transmissão de doenças causadas pela presença de micro-organismos ou por toxinas produzidas pelos mesmos.

A água e o gelo, apesar de não ser um meio de cultivo para bactérias, por falta de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento,

podem funcionar como um transferidor desses micro-organismos ao pescado. Uma vez empregando-se gelo preparado a partir de água poluída, contaminada com alguma bactéria que suporte 0 °C, esta imediatamente infectará os produtos, comprometendo a sua qualidade (VIEIRA, 2003).

A FAO (2004) propõe um modelo de pré-requisitos para a segurança e a qualidade da água e do gelo, com enfoque na água que entra em contato com o alimento ou sua superfície de contato ou é usada na fabricação do gelo, em que o tratamento empregado é decisivo para torná-la segura. Para tal, são estabelecidos critérios microbiológicos, como ausência de coliformes e enterococos em 100 mL de água, e contagem aeróbia em placa de  $10^2$  UFC/mL. O monitoramento da qualidade deve ser feita pela medição do cloro residual diariamente, e o controle microbiológico deve ser feito periodicamente.

A qualidade microbiológica da água é monitorada por níveis de bactérias indicadoras de contaminação fecal, como os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, enterococos e esporos de anaeróbios sulfito-redutores, que se relacionam com a probabilidade de presença de patógenos (TOURON et al., 2007).

Fransen et al., (1996) mostraram a importância da qualidade da água em indústrias de alimentos, ressaltando que, durante as operações de abate e demais operações, a água é utilizada em grandes quantidades, e caso não seja bem tratada pode agir como um agente disseminador de contaminantes.

Os padrões de qualidade estabelecidos para a água, seja ela para consumo ou uso na indústria, pela Legislação Brasileira, são:

Portaria nº 36, do Ministério da Saúde, que em seu Anexo apresenta as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, a serem observadas em todo o território nacional (BRASIL, 1990).

Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 54/2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que fixa um regulamento técnico para a identidade e a qualidade de água mineral natural e água natural (BRASIL, 2000).

Portaria nº 1.469, que estabelece a norma de qualidade da água para consumo humano (BRASIL, 2000).

Resolução da Diretoria Colegiada n. 275, que trata do Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural (BRASIL, 2002).

Portaria 518 – Padrões de Potabilidade que confere a qualidade da água para consumo humano (BRASIL, 2004).

## 4.6 TRATAMENTO TÉRMICO E A ELIMINAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

O processamento térmico é um método aplicado para o aumento da vida útil dos alimentos através da destruição dos micro-organismos pela ação do calor em duas modalidades principais: a pasteurização que se destina a eliminação de patógenos dos alimentos e a esterilização, cujo objetivo é a destruição dos micro-organismos presentes, esporulados ou não. No primeiro caso, a o alimento obtido é isento de micro-organismos patogênicos não-esporulados, enquanto o alimento esterilizado se torna microbiologicamente estável para ser armazenado durante longo tempo em temperatura ambiente, conforme o sistema de acondicionamento (ORDÓÑEZ et al, 2005). Com este processo, o alimento recebe um tratamento térmico para destruir micro-organismos patógenos ou deteriorantes, antinutrientes e de sistemas enzimáticos que causam degradação no alimento (DAVID; GRAVES; CARLSON, 1996).

O tratamento térmico de alimentos pode sofrer algumas falhas que trazem consequências ao produto final. A segurança microbiológica do alimento depende das condições de chegada da matéria-prima *in natura* ou pré-processada, e do controle posterior ao tratamento térmico, que consiste no monitoramento durante a manipulação, armazenamento e a qualidade dos lotes (DAVID; GRAVES; CARLSON, 1996).

A toxina estafilocócica apresenta problemas por ser altamente resistente, com um valor de  $D_{121\text{ }^{\circ}\text{C}}$  de 20 minutos, o que pode trazer sobrevivência mesmo após processos assépticos do tipo UHT. Assim, é mais fácil realizar o controle das células vegetativas do *S. aureus* do que inativar a sua toxina. Esse micro-organismo pode ser facilmente controlado ou eliminado via pasteurização, refrigeração, atividade de água e pH (DAVID; GRAVES; CARLSON, 1996).

Os micro-organismos psicrotróficos são facilmente controlados pelo calor, porém são capazes de crescer a temperaturas de refrigeração. Por isso, a presença desses micro-organismos pode comprometer o produto devido à secreção de enzimas altamente resistentes ao calor, como lípases e proteases. As enzimas produzidas tem potencial para sobreviver ao processo de esterilização e contribuir para os defeitos físicos como gelificação e *off-flavours* (DAVID; GRAVES; CARLSON, 1996).

O efeito do calor nos micro-organismos é útil para designar o tempo do tratamento térmico e temperaturas efetivas nos alimentos (FORSYTHE, 2002).

Os parâmetros utilizados para descrever a morte dos micro-organismos são (FRANCO; LANDGRAF, 2005; FORSYTHE, 2002):

- a) Tempo de destruição térmica (TDT): é o tempo necessário para destruir um certo número de micro-organismos a uma dada temperatura. A temperatura nesse caso é mantida constante e o tempo necessário para a destruição das células é determinado.
- b) Valor “D” ou “Razão Letal”: corresponde ao tempo, em minutos, em uma determinada temperatura, necessário para uma redução em 90 % no número de células ou esporos presentes numa suspensão. Em termos numéricos, esse valor é igual ao número de minutos necessários para que a curva de sobreviventes atravesse um ciclo logarítmico (1 valor log).
- c) Valor “z”: aumento de temperatura necessário para aumentar a velocidade de morte em 10 vezes, ou reduzir o valor D 10 vezes.
- d) Valor “F”: é o tempo, em minutos, a uma determinada temperatura, necessário para a destruição de esporos ou células vegetativas de um micro-organismo específico.

**Tabela 5** - Valores de D e z de esporos de células vegetativas de bactérias, bolores e leveduras.

<b>Micro-organismos</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Valor D (min)</b>	<b>Valor z (°C)</b>
<b>Esporos</b>			
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	121,1	4,0 - 5,0	7,7 - 12,2
<i>Clostridium botulinum</i>	121,1	0,1 - 0,2	7,7 - 10,0
<i>Clostridium perfringens</i>	100,0	0,31 - 17,6	6,0 - 17,2
<i>Bacillus cereus</i>	121,0	0,003 - 2,37	7,9 - 9,9
<i>Clostridium pasteurianum</i>	100,0	0,1 - 0,5	6,6 - 8,8
<b>Células Vegetativas de Bactéria</b>			
<i>Brucella</i> spp	65,5	0,5 - 1,0	4,4 - 5,5
<i>Salmonella</i> spp	65,5	0,02 - 0,25	4,4 - 5,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	65,5	0,2 - 2,0	4,4 - 6,5
<i>Staphylococcus pyogenes</i>	65,5	0,2 - 2,0	4,4 - 6,5
<i>Lactobacillus</i> spp	65,5	0,5 - 1,0	4,4 - 5,5
<b>Bolores e Leveduras</b>			
Células Vegetativas e Micélio	65,5	0,5 - 3,0	4,4 - 6,6
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	60,0	7,0 - 14,2	4,0 - 5,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60,0	8,2 - 22,2	4,5 - 5,0

Os valores de letalidade são importantes no gerenciamento e na otimização de processos que envolvem o tratamento térmico dos alimentos. Para tal, o conhecimento dos valores de resistência térmica dos esporos de cada micro-organismo envolvido é necessário para que as medidas de controle sejam eficazes.

A Tabela 5 apresenta os dados de valores D e z de esporos de células vegetativas de bactérias, bolores e leveduras, definidos por Stumbo (1973), conforme as condições de tratamento térmico comercial a que devem ser submetidos os alimentos de baixa acidez, de forma a eliminar os riscos da presença de esporos viáveis de bactérias que infectam e deterioram os alimentos industrializados.

#### **4.7 APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE QUALIDADE AO PROCESSAMENTO DE MOLUSCOS**

Um dos principais requisitos que se espera de um alimento é que este esteja em condições higiênicas adequadas e seguro para consumo. Por isso, segundo Forsythe (2002), a produção de alimentos requer:

- controle na fonte;
- controle do desenvolvimento e do processo dos produtos;
- boas práticas higiênicas durante a produção, o processamento, a manipulação, a distribuição, a estocagem, a venda, a preparação e a utilização;
- abordagem preventiva, uma vez que a efetividade dos testes microbiológicos de produtos finais é limitada.

As ferramentas de qualidade são essenciais para a aplicação dos itens citados, e no caso do processamento de moluscos, também contribuem para a padronização de processo e resolução de diversos problemas, oriundos de falhas, omissão ou realização inadequada dos procedimentos.

A implantação de ferramentas como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), detectam os problemas no processamento e os corrigem, promovendo a padronização de processos e a garantia da segurança alimentar. O uso dessas ferramentas deve ser constante e com supervisão contínua para garantir bons resultados.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATÉRIA-PRIMA

Os mexilhões utilizados neste trabalho foram cedidos por uma empresa de processamento de frutos do mar, situada na região da grande Florianópolis, SC. A seguir é apresentada a descrição do processamento da empresa.

### 5.2 PROCESSAMENTO DO MEXILHÃO *Perna perna*

Os mexilhões processados são provenientes de produtores da região Florianópolis – SC. Os mexilhões que chegam na unidade de beneficiamento são pesados e debulhados com o auxílio dos pés, conforme mostra a Figura 5 (MAEDA, 2008).



**Figura 5** - Debulhe e limpeza dos mexilhões para remoção de sujidades

A seguir, é feita a lavagem em tanque com água salgada para remoção das sujidades aderidas, onde os mexilhões são selecionados por tamanho através de um rolo mecanizado desenvolvido pela empresa (Figura 6), e os retidos no rolo seguem para o beneficiamento. Os mexilhões que passam pela malha do rolo são retirados, e têm sua sujidade retirada para serem colocados novamente em cordas ou pencas de cultivo para retornarem a área de cultivo até atingirem o tamanho adequado.



**Figura 6** - Rolo para lavagem e peneiramento dos mexilhões (MAEDA ,2008).

As conchas lavadas seguem para a parte interna da indústria, através de uma esteira, e em seguida são acondicionadas em caixas plásticas previamente higienizadas para posterior processo de cozimento. A Figura 7 apresenta a esteira de recebimento dos mexilhões e a Figura 8 o sistema de lavagem das caixas e seu armazenamento.



**Figura 7** - Esteira de recebimento das conchas higienizadas



**Figura 8** - Higienização das caixas plásticas e acondicionamento

Na etapa seguinte, os mexilhões passam pelo cozimento, com o objetivo de promover a abertura das valvas e seu desprendimento da parte interna da concha, bem como eliminar os micro-organismos patogênicos. O cozimento adotado pela indústria utiliza vapor à temperatura de 100 °C durante 5 minutos. Os mexilhões são colocados em cestos metálicos no interior de tanques cilíndricos, conforme apresentado pela Figura 9. O produto cozido é imerso em um tanque para resfriamento, contendo água e gelo durante alguns minutos, e em seguida são drenados e descascados manualmente. Os mexilhões descascados são colocados em recipientes do tipo peneira, em aço inox, para remoção do excesso de água e em seguida são acondicionados em caixas plásticas.



**Figura 9** - Tanque de cozimento e mexilhões sendo retirados após o processo

A Figura 10 mostra o tanque onde é realizado o resfriamento do mexilhão cozido e o descascamento manual.



**Figura 10** - Tanque de resfriamento e descascamento manual

Os mexilhões acondicionados nas caixas são pesados e imersos em tanque com água e gelo, para manutenção da temperatura. Após a

imersão, o produto é disposto em uma mesa para seleção manual, onde são descartados os mexilhões de menor tamanho, com coloração diferente do padrão ou fisicamente danificados. A Figura 11 apresenta o tanque de imersão e os mexilhões na etapa de seleção.



**Figura 11** - Tanque com água e gelo e os mexilhões para pesagem e seleção

### **5.2.1 Acondicionamento sob atmosfera modificada**

Os mexilhões selecionados são pesados e embalados com e sem injeção de gás, conforme o mercado destino de comercialização. A empresa produz o mexilhão cozido inteiro resfriado, mexilhão cozido meia-concha resfriado e mexilhão cozido desconchado resfriado. O acondicionamento é feito sob atmosfera modificada.

A atmosfera modificada utiliza uma mistura de gás elaborada especificamente para esse tipo de alimentos, da marca Linde, da linha MAPAX<sup>®</sup> e contém 50% de nitrogênio e 50% de dióxido de carbono. A empresa dispõe de dois tipos de envasadora: a primeira delas injeta o gás e sela a embalagem do tipo bandeja, conforme mostra a Figura 12. Nessa envasadora, duas bandejas com mexilhões são colocadas na máquina, estas são empurradas para a parte interna, onde recebem a injeção gasosa. Em seguida, as embalagens voltam para a parte externa onde o filme é colocado sobre a embalagem, ocorrendo a selagem da mesma. Em seguida, a embalagem recebe rótulo com as informações sobre peso e validade do produto na parte superior da embalagem.



**Figura 12** - Sistema de envase em embalagens do tipo bandeja de 250 g.

O segundo sistema de envase é aplicado para a injeção de gás e selagem das embalagens flexíveis. A indústria possui duas envasadoras deste tipo, sendo uma delas do tipo dupla (com duas divisões para até quatro embalagens) e a outra para embalagens grandes, de 1 a 5 kg, tanto de mexilhões com casca quanto para mexilhões sem casca e a granel. A Figura 13 apresenta as envasadoras deste tipo.



**Figura 13** - Equipamento de envase para embalagens flexíveis

O sistema possui na parte interna quatro bicos metálicos, onde as embalagens são colocadas e a tampa superior é fechada. O ajuste dos tempos de vácuo e de injeção de gás é realizado conforme a necessidade do produto (no caso dos mexilhões resfriados, os tempos utilizados são: 17 s de vácuo, 6 s da mistura gasosa e 3 s de selagem). O vácuo é aplicado inicialmente nas embalagens para a retirada do ar ambiente, e em seguida ocorre a injeção do gás e a selagem no próprio equipamento.

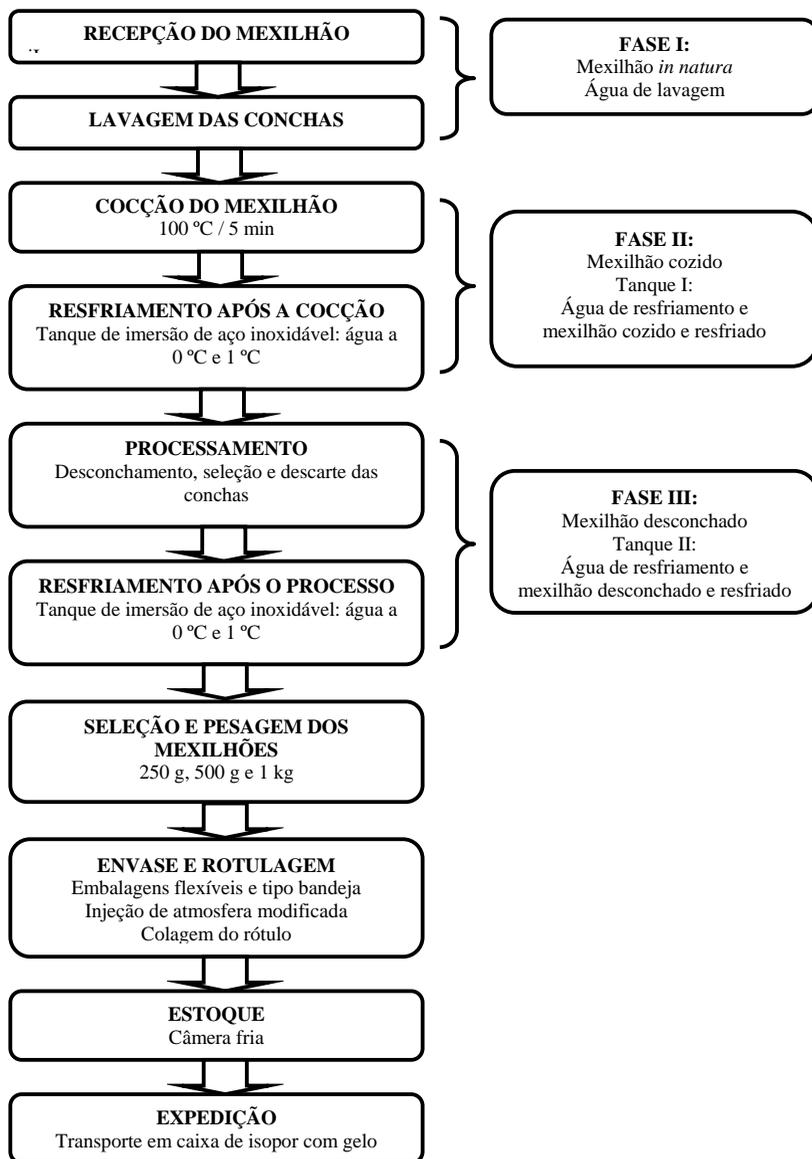
O controle do acondicionamento (selagem e integridade da embalagem) é feito pela imersão da embalagem em água, observando a formação ou não de bolhas de ar na água. A Figura 14 mostra o teste para verificação da integridade das embalagens.



**Figura 14** - Medida de controle para verificar a selagem nas embalagens

O produto envasado é acondicionado em caixas plásticas e armazenado em câmara fria a 3 °C. Para a expedição, o produto é retirado da câmara e as embalagens são condicionadas em caixas de isopor com gelo e revestidas com plástico, evitando o contato direto com o gelo. As caixas de isopor são transportadas em caminhões e distribuídas para o mercado consumidor, conforme já descrito anteriormente, cujo esquema está apresentado no fluxograma da Figura 15.

Os mexilhões utilizados nos experimentos seguiram o processamento descrito e estes foram acondicionados em embalagens flexíveis de 250 g com atmosfera modificada, cuja proporção de gases foi a usada pela indústria, com 50% de CO<sub>2</sub> e 50% de N<sub>2</sub>, e ar atmosférico (sem atmosfera modificada) e condicionado a 3°C. As amostras de mexilhão pré-cozido foram embaladas desta forma e transportadas em isopor com gelo até o Laboratório de Propriedades Físicas da UFSC (PROFI).



**Figura 15** - Fluxograma de processamento do mexilhão realizado na indústria

## **5.3 ANÁLISES DO PRODUTO**

### **5.3.1 Composição centesimal**

#### **5.3.1.1 Umidade**

O conteúdo de umidade dos mexilhões foi determinado conforme método do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2009). Foram utilizados 5 g de amostra, submetidas ao aquecimento em estufa a 105 °C até obter massa constante, com determinações em triplicata.

#### **5.3.1.2 Lipídeos**

O teor de lipídeos foi realizado conforme Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2009). Foram utilizados 5 g de amostra para extração de lipídeos pelo método Soxhlet, utilizando como solvente o éter de petróleo, partindo da amostra desidratada. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – LABCAL da UFSC.

#### **5.3.1.3 Proteína**

O teor de proteína dos mexilhões foi determinado em método de digestão Kjeldahl, utilizando 2 g de amostra, conforme Instrução Normativa nº 20, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000). As análises foram realizadas no Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – LABCAL da UFSC.

#### **5.3.1.4 Cinzas**

A determinação de cinzas seguiu o método 920.153 da AOAC (1998). O conteúdo de cinzas foi determinado em 5 g de amostra, previamente seca em estufa, a 105 °C. As amostras foram carbonizadas em temperatura baixa (com bico de Bunsen) e incineradas em mufla a 550 °C até eliminação completa do carvão e apresentarem aparência branca ou ligeiramente acinzentada.

### **5.3.1.5 Carboidratos**

Os carboidratos do mexilhão foram determinados segundo a fração NIFEXT, obtida pelo cálculo de diferença das outras frações da composição centesimal analisadas, de acordo com Hungerford (1995).

## **5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

As propriedades físico-químicas do mexilhão processado foram avaliadas ao longo do tempo de armazenamento. O período estipulado para a realização das análises foi: 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21 e 25 dias para os mexilhões processados e acondicionados com e sem atmosfera modificada na empresa.

### **5.4.1 pH**

O pH dos mexilhões foi determinado por método eletrométrico, em pHmetro digital Quimis modelo Q400A, no Laboratório de Propriedades Físicas da UFSC (PROFI). A leitura do pH foi realizada conforme a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL 1981); onde 50 g de amostra foram homogeneizadas em liquidificador até a formação de uma pasta. Em seguida o eletrodo do pHmetro foi inserido diretamente na amostra preparada, com leituras em triplicata.

### **5.4.2 Determinação da cor**

A cor foi determinada em leitura direta das amostras em colorímetro Minolta marca modelo CR-400, utilizando sistema de iluminação D65 e ângulo de observação de 8°. Foram avaliados os parâmetros de cor das escalas CIELab e CIELCh, onde: L\* (luminosidade, 0 a 100 – preto ao branco), as coordenadas de cromaticidade a\* e b\* que indicam (-a = verde e +a = vermelho; -b = azul e +b = amarelo). O “C” representa o croma e o “h” o ângulo de matiz.

O colorímetro foi calibrado com uma placa branca padrão (Y = 93,5; x = 0,3164; y = 0,3325), conforme instruções do fabricante.

Foi calculado o fator  $\Delta E$ , que é um valor numérico que expressa a diferença entre os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  da amostra padrão no espaço. Esse fator indica o tamanho da diferença de cor, mas não indica a direção em que as cores são diferentes. É definido pela Equação 1:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Os parâmetros de cor foram analisados nos mexilhões embalados nas diferentes condições de atmosfera ao longo do tempo de armazenamento. Foram realizadas leituras em 10 mexilhões machos e em 10 mexilhões fêmeas, em ambos os lados, em triplicata de cada experimento, totalizando 60 amostras e 180 pontos.

As análises de cor foram realizadas no Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 5.4.3 Atividade de água ( $A_w$ )

A atividade de água dos mexilhões foi determinada no equipamento Aqualab, da Decagon Devices. Após a calibração do equipamento, 5 g de amostra foi colocada no aparelho e a leitura realizada automaticamente. Esse parâmetro foi determinado para mexilhões machos e fêmeas.

## 5.5 Análise estatística

Os dados de caracterização físico-química dos mexilhões foram tratados através da análise de ANOVA, a fim de verificar se havia diferença significativa entre as atmosferas modificadas utilizadas, e se havia mudanças nos parâmetros físico-químicos com o tempo de armazenamento para as atmosferas. A comparação de médias para os fatores que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi realizada através do teste de Tukey. O software “*Statistica 7.0*” foi utilizado para ambos os testes.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DE GASES DENTRO DO PRODUTO ENVASADO

A caracterização de gases foi realizada nos dois tipos de embalagem que a empresa comercializa os seus produtos (tipo bandeja – 250g e flexível – 500 g).

As concentrações de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no interior das embalagens foram determinadas por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo gasoso, modelo CG 35, com detector de condutividade térmica, peneira molecular e coluna de Porapak Q, utilizando Hélio como gás de arraste com vazão de 30 mL/min. A temperatura do detector foi de 130 °C e a coluna de 50 °C e corrente de 240 mA. As amostras de gás padrão foram retiradas à pressão de 1 atm.

Adaptou-se um septo de borracha no lado externo da embalagem e o gás foi retirado com uma seringa de 1µL e injetado no cromatógrafo.

## 5.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A avaliação microbiológica foi realizada no produto final, nos mexilhões durante o processamento e na água envolvida. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – LABCAL da UFSC. Os métodos utilizados para estes ensaios são descritos conforme A.P.H.A. – *American Public Health Association* (2001).

### 5.7.1 Produto final

O produto final foi analisado no período inicial e durante o armazenamento em câmara fria a  $3 \pm 1$  °C, com intervalo de 7 dias. A Tabela 6 mostra as análises microbiológicas no produto final no período inicial e ao longo do armazenamento.

**Tabela 6** - Análises microbiológicas no produto final

AMOSTRAS	TEMPO DE VIDA ÚTIL	MICRO-ORGANISMOS PESQUISADOS
Mexilhão processado	Tempo inicial	<i>Coliformes a 45°C</i> <i>Estafilococos coagulase positivo</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Psicrófilos</i> <i>Psicrotróficos</i> <i>Vibrio</i> sp
Mexilhão processado	Intervalos de 7 dias	<i>Psicrófilos</i> <i>Psicrotróficos</i> <i>Vibrio</i> sp

## 5.8 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO DOS MEXILHÕES

A avaliação microbiológica do processo foi realizada conforme mostrado na Tabela 7, para identificar possíveis focos de contaminação, e quais micro-organismos estão envolvidos. Assim, realizaram-se as coletas dos mexilhões e da água utilizada em cada etapa do processamento, desde o debulhe e lavagem até a pesagem para envase.

Para confrontar com os resultados para microbiota dos mexilhões processados na empresa, foi realizado no laboratório a lavagem, seleção e cozimento de mexilhões do mesmo lote utilizado na empresa.

**Tabela 7** - Análises microbiológicas realizadas na água e no mexilhão em processamento

AMOSTRAS	ETAPA DE PROCESSAMENTO	MICROBIOTA ANALISADA
Mexilhão <i>in natura</i> Água de lavagem	Fase I: desconche e análise do mexilhão	Coliformes a 35°C Estafilococos coagulase positivo
- Água do tanque de resfriamento I; - Mexilhão cozido não submetido ao resfriamento; - Mexilhão cozido e resfriado no Tanque I;	Fase II: Cocção do mexilhão e resfriamento	<i>Salmonella</i> sp Clostrídio sulfito-redutores
- Mexilhão desconchado não submetido ao resfriamento; - Mexilhão resfriado no Tanque II; - Água do tanque de resfriamento II;	Fase III: Desconchamento do mexilhão	<i>Pseudomonas</i> sp. Psicrófilos Psicrotróficos <i>Vibrio</i> sp

## 5.9 ANÁLISES COMPLEMENTARES DA ÁGUA UTILIZADA NO PROCESSAMENTO DE MEXILHÕES E DO TRATAMENTO TÉRMICO

O pH foi quantificado através da imersão de fitas de teste de pH nos tanques de lavagem e de resfriamento. A temperatura foi determinada através da imersão de termômetros portáteis em diferentes pontos do tanque.

O perfil de temperatura da cocção no processo industrial foi medido com a aplicação de três termopares do tipo T, sendo o primeiro instalado na superfície do cesto de cocção; o segundo na lateral do cesto de cocção e na parte interna do mexilhão e o último termopar instalado no centro do cesto, entre as conchas. Os dados foram coletados por um sistema informatizado de aquisição de dados Agilent, modelo 349470A, com fabricação na Malasia, através do programa Agilent Bench Link Data Logger 3.0 e graficados em função do tempo de cocção de 5 minutos.

O micro-organismo alvo considerado para os cálculos dos parâmetros de tratamento térmico foi o *Clostridium botulinum*, por este ser o micro-organismo mais resistente ao tratamento térmico em alimentos de baixa acidez, como é o caso do mexilhão.

Os parâmetros calculados foram o valor F ou esterilidade do processo e a esterilidade requerida (tempo requerido para atingir o grau de redução da população microbiana até o nível desejado). Com esses valores, estimou-se se o número de reduções decimais requeridas para o *Clostridium botulinum* era atingida para este processo. A seguir estão apresentadas as equações que descrevem os cálculos de letalidade dos micro-organismos (MAFART et al., 2010).

$$F = \int_0^t L(T)dt \quad \text{Equação (2)}$$

Com:

$$L(T) = 10^{-\left(\frac{T-T^*}{z}\right)} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

T = temperatura de exposição do alimento

T\* = temperatura de referência (121 °C)

L(T) = fator de letalidade

z = é a mudança na temperatura necessária para aumentar a taxa de inativação microbiana em 10 vezes (um ciclo logarítmico)

O cálculo de F torna-se o somatório dos valores de letalidade obtidos para cada intervalo de temperatura atingido durante todo o tratamento térmico, conforme apresentado na Equação 4.

$$F = \sum_0^t L(t) \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

$L(T)$  = fator de letalidade, no intervalo de 0 a  $t_{\text{final}}$ , durante o período de tratamento térmico.

$z$  = é a mudança na temperatura necessária para aumentar a taxa de inativação microbiana em 10 vezes (um ciclo logarítmico)

Com o tempo de redução decimal ( $D$ ) à temperatura de processo, o número de reduções decimais obtido para cada tipo de micro-organismo no processo foi calculado, a partir da Equação 5:

$$F = \gamma \cdot D^* \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

$\gamma$  = número de reduções decimais do processo

$D^*$  = tempo de redução decimal a temperatura de referência (121 °C)

Com os valores de reduções decimais e os valores de letalidade do processo e o recomendado pela literatura, realizou-se a comparação para definir a eficácia do tratamento térmico, onde valores de letalidade do processo maiores que os recomendados indicam que o processo elimina 99% da carga microbiana; enquanto valores menores que os recomendados indicam que o processo é inadequado para a eliminação de micro-organismos no processo.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal do mexilhão é sazonal, pois é influenciada por fatores, como estação do ano, período reprodutivo, origem e área da cultura, e à disponibilidade de nutrientes e o alimento disponível ao longo do ano (FUENTES et al., 2009; TAVARES et al., 1998).

A composição centesimal obtida para o mexilhão *Perna perna*, cozido e resfriado utilizado neste trabalho está apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8** - Composição centesimal do mexilhão *Perna perna* cozido e resfriado

Composto	Valor (%) $\pm$ D.P.
Umidade	76,4 $\pm$ 0,2
Proteínas	13,98 $\pm$ 0,1
Carboidratos (Fração Nifext)	6,4 $\pm$ 0,3
Lipídios	2,16 $\pm$ 0,1
Cinzas	2,06 $\pm$ 0,25
Total	100

Os mexilhões apresentaram alto teor de umidade de 76,4 %, compatível com a encontrada por Tavares et al., (1998), que obtiveram 72,12 % de umidade. Pedrosa e Cozzolino (2001) encontraram 83,89 % de umidade ao analisar a composição centesimal de mexilhão do tipo *Anomalocardia brasiliiana*. Furlan et al., (2007) também encontraram valores de umidade de 84,19 %, 83,16 % e 83,94 % para mexilhão *Perna perna*, superiores aos obtidos neste trabalho. A variação no conteúdo de umidade observada nos diferentes trabalhos pode ser justificada pelos diferentes métodos que são utilizados no desconchamento dos mexilhões onde geralmente as valvas são abertas por pré-cocção, e na pesquisa realizada por esses autores, as valvas foram abertas nos mexilhões ainda vivos, pelo corte do músculo adutor e ainda a diferença pode ser pela diferença das espécies estudadas (Furlan et al, 2007).

Os mexilhões são considerados uma fonte protéica de alto valor nutritivo, com teores superiores aos encontrados em ostras (5,7%) e

entre a maioria dos peixes marinhos (MARQUES, 1998). O conteúdo de proteína obtido neste trabalho está compatível com o encontrado por Cordeiro et al., (2007), que obtiveram 13% de proteína para o mexilhão *Perna perna*. Tavares et al., (1998) obtiveram um valor superior em média de 20,5% de proteínas. Fuentes et al (2009) obtiveram valores de proteína entre 6,5 a 10% para mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*. Magalhães (1985) apud Furlan et al. (2007) justificam que as variações nos resultados de teor protéico podem ser encontrados mesmo em mexilhões da mesma espécie, o que é justificado pelas diferenças na região de coleta dos animais e diferentes estágios de desenvolvimento dos mesmos.

O conteúdo de carboidratos dos mexilhões é dependente do ciclo reprodutivo do animal. No período de reprodução, devido à produção de gametas, o conteúdo de carboidratos aumenta. O teor encontrado para os mexilhões de 6,4 % neste estudo pode ser considerado alto em relação a outros estudos, cujos valores ficam em torno de 2 %. Esse resultado pode ser justificado pelo fato dos mexilhões estarem no período reprodutivo. Os carboidratos presentes no mexilhão estão na forma de glicogênio em sua maioria, e este valor, segundo Silva (2000) apud Cordeiro et al., (2007), fica entre 1 a 7 %, em proporção elevada em relação às outras carnes e peixes.

O teor de lipídeos encontrado nos mexilhões utilizados neste trabalho foi 2,16 % mostrando seu baixo conteúdo de gordura. Tavares et al., (1998) encontraram um teor lipídico médio de 3,24 % e enquadrou o molusco na categoria semi-gordo. Moluscos e peixes com conteúdos lipídicos inferiores a 5 % são considerados de baixo teor de gordura. O teor de cinzas obtidos neste trabalho de 2,06 % é compatível com o encontrado em outros trabalhos de pesquisa. Tavares et al., (1998) obtiveram valor médio semelhante (2,42 %) e explicam que esse valor foi alto quando comparado ao reportado para mexilhão na literatura de - 1 % a 1,5 %, mas atribuem o valor mais elevado ao conteúdo significativo de sais minerais da carne deste molusco, principalmente potássio e cálcio. Fuentes et al., (2009) estudaram a composição centesimal de mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis in natura* provenientes de várias regiões da Espanha, e encontraram os seguintes teores de cinzas: 2,2 %, 3,37 % e 3,38 %, maiores que o encontrados para este trabalho.

## 6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 6.2.1 pH

A Tabela 9 apresenta as médias das triplicatas de pH e umidade obtidas ao longo do tempo e para as atmosferas testadas.

**Tabela 9** - Médias das triplicatas dos valores de pH e umidade com e sem atmosfera modificada, durante 25 dias.

Tempo (dias)	pH		Umidade	
	Gás	Controle	Gás	Controle
0	6,56 <sup>ca</sup>	6,65 <sup>deA</sup>	77,21 <sup>aA</sup>	76,80 <sup>aA</sup>
4	6,59 <sup>ca</sup>	6,67 <sup>deA</sup>	76,23 <sup>aA</sup>	75,67 <sup>aA</sup>
7	6,49 <sup>bcA</sup>	6,75 <sup>ca</sup>	76,03 <sup>aA</sup>	79,08 <sup>aA</sup>
11	6,49 <sup>bcA</sup>	6,47 <sup>bcdA</sup>	72,59 <sup>aA</sup>	78,07 <sup>aA</sup>
14	6,40 <sup>bcA</sup>	6,23 <sup>bcdA</sup>	77,5 <sup>aA</sup>	73,97 <sup>aA</sup>
18	6,08 <sup>abA</sup>	6,02 <sup>abcA</sup>	75,95 <sup>aA</sup>	75,52 <sup>aA</sup>
21	5,89 <sup>aA</sup>	5,78 <sup>abA</sup>	76,43 <sup>aA</sup>	77,07 <sup>aA</sup>
25	5,82 <sup>aA</sup>	5,66 <sup>aA</sup>	76,85 <sup>aA</sup>	76,97 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

A Tabela 10 apresenta as médias das triplicatas de atividade de água de machos e fêmeas obtidas ao longo do tempo e para as atmosferas testadas.

**Tabela 10** - Médias das triplicatas dos valores de atividade de água para macho e fêmeas com e sem atmosfera modificada, durante 25 dias.

Tempo(dias)	Aw Macho		Aw Fêmea	
	Gás	Controle	Gás	Controle
0	0,994 <sup>abA</sup>	0,995 <sup>abA</sup>	0,994 <sup>abA</sup>	0,995 <sup>bA</sup>
4	0,988 <sup>aA</sup>	0,989 <sup>aA</sup>	0,989 <sup>aA</sup>	0,987 <sup>abA</sup>
7	0,995 <sup>abA</sup>	0,996 <sup>bA</sup>	0,995 <sup>abA</sup>	0,996 <sup>bA</sup>
11	0,997 <sup>bA</sup>	0,996 <sup>bA</sup>	0,998 <sup>bA</sup>	0,997 <sup>bA</sup>
14	0,996 <sup>bA</sup>	0,995 <sup>bA</sup>	0,996 <sup>bA</sup>	0,995 <sup>bA</sup>
18	0,988 <sup>aA</sup>	0,986 <sup>aA</sup>	0,98 <sup>aA</sup>	0,98 <sup>aA</sup>
21	0,993 <sup>abA</sup>	0,994 <sup>abA</sup>	0,993 <sup>abA</sup>	0,993 <sup>bA</sup>
25	0,994 <sup>abA</sup>	0,994 <sup>abA</sup>	0,993 <sup>abA</sup>	0,994 <sup>bA</sup>

Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

Os valores de pH encontrados para os mexilhões acondicionados com atmosfera modificada e ar atmosférico não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Os valores de pH estabelecidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1980), para pescado e derivados são inferiores a 6,5 na parte interna da carne e 6,8 na parte externa da carne. Os valores encontrados foram de 6,56 e 6,65, com e sem atmosfera modificada, respectivamente. Considerando que não há limites de pH estabelecidos exclusivamente para mexilhão e que o método de pH para quantificar essa variável utiliza a parte interna e externa da carne simultaneamente, são aceitáveis os valores de pH obtidos neste trabalho dentro da faixa estabelecida. Ao longo do período, os valores apresentaram um declínio significativo ( $p < 0,05$ ).

Os valores encontrados para o pH inicial estão de acordo com os valores iniciais obtidos por Salán (2005) para mexilhões processados, que variaram de 5,8 a 7,11. Por outro lado, está abaixo dos valores obtidos por Cordeiro et al., (2007), de 6,9 para mexilhão submetido à cocção.

Valores mais baixos de pH podem ser justificados em atmosfera modificada na presença de  $\text{CO}_2$  em virtude da solubilidade do gás na água e lipídeos contidos no produto, o que acidifica o meio. Caglak et al., (2008) obtiveram declínio do pH de mexilhões defumados da espécie *Mytilus galloprovincialis* armazenados em atmosfera modificada contendo 50%  $\text{N}_2$  + 50 %  $\text{O}_2$ , com valor inicial de 6,72; após 8 dias o pH foi de 6,38 e por fim, de 5,99 aos 12 dias de armazenamento a 2°C. Os mesmos autores utilizaram os valores de uma escala de pH para frescor de ostras como parâmetro para mexilhões, onde o pH de 6,2 – 5,9 é considerado bom; pH de 5,7 – 5,5 é inadequado e para  $\text{pH} \leq 5,2$ , caracterizado como pútrido. Seguindo essa convenção, o limite do valor de pH para comercialização do produto é de 5,9. No presente estudo o mexilhão utilizado pode ser considerado bom no que tange ao pH para consumo até o 18º dia.

Erkan (2005) estudou as mudanças na qualidade de mexilhão cozido da espécie *Mytilus galloprovincialis* durante o armazenamento em refrigeração a 4 °C, e obteve uma redução não significativa do pH em 6 dias de armazenamento (5,96 para 5,89), e não conseguiu correlacionar a variação de pH com a qualidade sensorial do produto.

Galvão et al., (2006) mostraram que há a necessidade de estudos específicos para os limites de pH para moluscos bivalves, pois estes possuem comportamento diferente das espécies de pescado, em relação à decomposição e alteração de pH.

### 6.2.2 Conteúdo de Umidade

As médias de umidade dos mexilhões obtidos neste trabalho encontram-se na faixa de 72,59 a 79,08 % e se manteve ao longo dos 25 dias, nas duas condições estudadas, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A manutenção da umidade nas embalagens foi observada no interior das embalagens, durante a manipulação do produto para as análises e no decorrer do armazenamento.

Um fator interferente no conteúdo de umidade no produto é o tipo de embalagem utilizada. A embalagem multicamada utilizada neste trabalho é constituída de uma mistura de PEBD (Polietileno de baixa densidade) e PEL (Polietileno aditivados) e poliamida (CELOFIX, 2009) possui alta barreira ao vapor d'água, aumentando essa propriedade quando condicionada a baixas temperaturas. Entretanto, estudos complementares sobre a capacidade de retenção de água desse molusco e a interação com esse tipo de embalagem são necessários para se estabelecer um comportamento mais definido da migração da água contida no alimento para a embalagem.

Os valores encontrados são mais baixos do que os obtidos por Pedrosa e Cozzolino (2001), de 83,89 %; e de Cordeiro et al., (2007), de 81 % para mexilhões submetidos à cocção. Os valores encontrados são próximos aos de Tavares et al., (1998), que obtiveram 72,12%.

O controle da umidade dentro da embalagem é um fator muito importante, pois a ausência causa o ressecamento do produto, enquanto o excesso pode promover crescimento microbiano e colapso das células. Nas carnes processadas e resfriadas, ocorre a formação de gotículas de água na parte interna do filme que caem sobre a carne, aumentando o conteúdo de água, baixando o pH e criando condições para o crescimento microbiano, que torna o alimento invisível por “turvar” a superfície interna. Como medida, são colocadas almofadas absorventes para o controle da umidade (NOVAK et al., 2003).

### 6.2.3 Atividade de água ( $a_w$ )

O critério a ser estabelecido para indicar a estabilidade de um alimento está diretamente relacionado com a quantidade de água presente, que inclui a concentração de solutos e pressão osmótica, porém a atividade de água é o indicativo mais efetivo de quantidade de água em alimentos relacionada com o crescimento microbiano e atividade

enzimática (MCLAUGHLIN; MAGEE, 1998).

A atividade de água encontrada para os mexilhões neste trabalho teve valor médio de 0,99 para machos e fêmeas (Tabela 10). Não houve diferença significativa entre as atmosferas ( $p > 0,05$ ), apenas em relação aos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ), o que pode ser justificado pela oscilação nas determinações. Contudo, não foi possível estabelecer uma tendência à redução ou aumento desse parâmetro. Os machos e fêmeas não apresentaram diferença entre si quanto a estrutura e em relação aos valores de atividade de água obtidos, o que se observou durante a manipulação dos mexilhões é que apresentaram certo “amolecimento” da carne no decorrer do período.

Goulas et al. (2005) apud Caglak et al. (2008) apresentam valor de atividade de água de 0,95 para mexilhões, valor abaixo dos obtidos para este trabalho. Essa diferença pode ser associada às diferenças no processamento. Para carne fresca, com teor de umidade de 70%, o valor de 0,985 é a atividade de água equivalente (FELLOWS, 1994), o que justifica a alta atividade de água encontrada para os mexilhões neste trabalho. O mesmo autor mostra que a vida útil de um alimento é determinada pela disponibilidade da água para as atividades microbiológicas, enzimáticas ou químicas para realizar as reações. Em alimentos com atividade de água próximos a 1, a perecibilidade é muito alta (FELLOWS, 1984; MCLAUGHLIN; MAGEE, 1998). Por isso o conhecimento da atividade de água do alimento é importante para saber seu potencial para deterioração e os cuidados que devem ser tomados.

#### 6.2.4 Cor

Os parâmetros de cor foram analisados nas amostras, em machos e fêmeas, durante o armazenamento. Nos machos, o parâmetro  $L^*$  apresentou diferença significativa entre as atmosferas ( $p < 0,05$ ), o parâmetro  $a^*$  teve diferença em relação ao tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ), enquanto o parâmetro  $b^*$  foi influenciado tanto pelas atmosferas quanto pelo período de estocagem ( $p < 0,05$ ). O aumento nos valores de  $a^*$  e  $b^*$  confirma a tendência para a cor vermelha e amarela. Para as fêmeas, somente o parâmetro  $L^*$  foi significativo ( $p > 0,05$ ) em relação ao tempo de armazenamento com aumento ao longo do período. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas duas condições de acondicionamento e com o tempo de armazenamento.

O fato das amostras serem destrutíveis, a cada análise era usada

uma nova amostra e sabe-se que existe desuniformidade na cor. Assim, esperava-se mudança da cor no decorrer do período, e no entanto, houve comportamento constante da cor e sem alteração significativa para as fêmeas, embora visualmente os mexilhões mais deteriorados apresentassem cor mais escura, onde a cor da fêmea apresentou a tendência do laranja à cor avermelhada, e o macho da cor branca à uma cor que visualmente lembra o marrom. Colby et al., (1993) apud Huis in't Veld (1996) afirma que durante a deterioração ocorre a oxidação de pigmentos, em especial os carotenóides.

O croma (C\*) e o ângulo de matiz sofreram influência significativa ( $p < 0,05$ ) pelo tempo de armazenamento nos mexilhões machos. Nas amostras de mexilhão fêmea o tempo de armazenamento e as diferentes atmosferas não apresentaram influência significativa ( $p > 0,05$ ) nesses parâmetros de cor. Estas últimas coordenadas demonstraram uma variação em relação ao sistema CIELab, que é baseado em valores tristimulares XYZ definidos por CIE, e os parâmetros de cor no espaço  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , para relacionar as diferenças de cor com maior uniformidade em relação ao visual (KONICA MINOLTA, 1998). A Tabela 11 apresenta os resultados relativos aos parâmetros de cromaticidade CIELab para mexilhões machos e fêmeas.

**Tabela 11** - Parâmetros de cromaticidade CIELab para mexilhões machos

Tempo (dias)	L* Macho		a* Macho		b* Macho	
	Gás	Controle	Gás	Controle	Gás	Controle
0	77,31 <sup>aA</sup>	72,76 <sup>abB</sup>	4,05 <sup>aA</sup>	4,01 <sup>abA</sup>	19,18 <sup>aA</sup>	26,31 <sup>ab</sup>
4	76,23 <sup>aA</sup>	73,20 <sup>ba</sup>	5,03 <sup>aA</sup>	4,31 <sup>abA</sup>	20,01 <sup>ba</sup>	26,44 <sup>ab</sup>
7	76,03 <sup>aA</sup>	70,70 <sup>ab</sup>	4,64 <sup>aA</sup>	4,72 <sup>abA</sup>	20,58 <sup>ba</sup>	27,01 <sup>ab</sup>
11	75,59 <sup>aA</sup>	71,37 <sup>abA</sup>	4,37 <sup>aA</sup>	4,48 <sup>abA</sup>	18,24 <sup>aA</sup>	26,84 <sup>ab</sup>
14	77,51 <sup>aA</sup>	71,24 <sup>abB</sup>	4,89 <sup>aA</sup>	4,98 <sup>abA</sup>	20,59 <sup>abA</sup>	26,59 <sup>ab</sup>
18	75,95 <sup>aA</sup>	72,27 <sup>abA</sup>	7,28 <sup>ba</sup>	6,01 <sup>ba</sup>	20,81 <sup>ba</sup>	26,76 <sup>aA</sup>
21	76,43 <sup>aA</sup>	72,05 <sup>abA</sup>	5,22 <sup>aA</sup>	5,12 <sup>abA</sup>	19,69 <sup>ba</sup>	26,14 <sup>aA</sup>
25	76,85 <sup>aA</sup>	71,96 <sup>abB</sup>	5,27 <sup>aA</sup>	5,24 <sup>abA</sup>	19,58 <sup>ba</sup>	27,07 <sup>ab</sup>

Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

Caglak et al., (2008) quantificaram os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* armazenados sob atmosfera modificada durante 12 dias. O parâmetro  $L^*$  apresentou queda nos valores para todas as atmosferas testadas pelos autores ao longo do

tempo (sacola plástica, embalagem a vácuo, mexilhões defumados com atmosfera modificada: 50 % N<sub>2</sub> + 50 % CO<sub>2</sub>, mexilhões com atmosfera modificada: 20 % N<sub>2</sub> + 80 % CO<sub>2</sub> e mexilhões com atmosfera modificada: 35 % N<sub>2</sub> + 65 % CO<sub>2</sub>), a\* manteve-se constante e houve aumento de b\*. Houve variações entre as atmosferas, o que demonstra que as proporções de gases utilizadas podem promover diferenças na cor dos mexilhões armazenados. A diferença entre os resultados é provavelmente influenciada tanto pelo tipo de matéria-prima quanto pela composição de gases utilizada. As Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados relativos aos parâmetros das escalas de cor CIELab para mexilhões machos e fêmeas.

**Tabela 12** - Parâmetros de cromaticidade CIELab para mexilhões fêmeas

Tempo (dias)	L* Fêmea		a* Fêmea		b* Fêmea	
	Gás	Controle	Gás	Controle	Gás	Controle
0	55,85 <sup>abA</sup>	56,57 <sup>aA</sup>	33,69 <sup>aA</sup>	33,45 <sup>aA</sup>	51,25 <sup>aA</sup>	51,07 <sup>aA</sup>
4	57,00 <sup>abA</sup>	55,63 <sup>aA</sup>	35,33 <sup>aA</sup>	35,11 <sup>aA</sup>	53,53 <sup>aA</sup>	52,69 <sup>aA</sup>
7	56,34 <sup>abA</sup>	56,63 <sup>aA</sup>	33,57 <sup>aA</sup>	33,31 <sup>aA</sup>	52,18 <sup>aA</sup>	51,78 <sup>aA</sup>
11	55,28 <sup>abA</sup>	56,63 <sup>aA</sup>	32,46 <sup>aA</sup>	34,79 <sup>aA</sup>	50,51 <sup>aA</sup>	52,79 <sup>aA</sup>
14	55,82 <sup>abA</sup>	56,50 <sup>aA</sup>	39,76 <sup>a</sup>	33,96 <sup>aA</sup>	52,15 <sup>aA</sup>	52,10 <sup>aA</sup>
18	56,42 <sup>abA</sup>	56,34 <sup>aA</sup>	34,19 <sup>aA</sup>	34,48 <sup>aA</sup>	52,00 <sup>aA</sup>	53,00 <sup>aA</sup>
21	56,70 <sup>abA</sup>	56,84 <sup>aA</sup>	33,84 <sup>aA</sup>	33,08 <sup>aA</sup>	52,72 <sup>aA</sup>	50,84 <sup>aA</sup>
25	57,36 <sup>bA</sup>	57,44 <sup>aA</sup>	33,97 <sup>aA</sup>	33,77 <sup>aA</sup>	51,98 <sup>aA</sup>	52,64 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

As tabelas 13 e 14 apresentam os parâmetros de cromaticidade da escala CIELCh para machos e fêmeas, respectivamente.

O parâmetro  $\Delta E$  é usado para quantificar a diferença de cor entre as amostras nos diferentes tratamentos ao longo do período. Os resultados obtidos mostram variação na coloração dos mexilhões durante o tempo de armazenamento. Entretanto, para as fêmeas não houve mudança significativa de cor durante o período e entre as atmosferas ( $p \geq 0,05$ ), enquanto para os machos houve mudança significativa ( $p \leq 0,05$ ) ao longo do tempo, e maior diferença ( $p < 0,05$ ) entre 18 e 25 dias de armazenamento, onde houve um aumento na diferença de cor para machos acondicionados em atmosfera modificada, conforme apresenta a Tabela 15.

**Tabela 13** - Parâmetros de cromaticidade CIELCh para mexilhões machos

Tempo (dias)	C* Macho		h Macho	
	Gás	Controle	Gás	Controle
0	20,14 <sup>aA</sup>	20,17 <sup>aA</sup>	78,36 <sup>bA</sup>	79,23 <sup>dA</sup>
4	20,98 <sup>abA</sup>	20,71 <sup>abA</sup>	76,16 <sup>abA</sup>	78,08 <sup>bcdA</sup>
7	21,33 <sup>abcA</sup>	21,49 <sup>abcA</sup>	77,52 <sup>abA</sup>	77,39 <sup>abcA</sup>
11	20,63 <sup>aA</sup>	22,13 <sup>abcA</sup>	77,76 <sup>abA</sup>	78,37 <sup>cdA</sup>
14	21,35 <sup>abcA</sup>	21,75 <sup>abcA</sup>	76,84 <sup>abA</sup>	76,76 <sup>abA</sup>
18	23,04 <sup>cA</sup>	23,40 <sup>cA</sup>	76,43 <sup>aA</sup>	77,74 <sup>abcdA</sup>
21	22,54 <sup>bcA</sup>	21,8 <sup>abcA</sup>	76,63 <sup>abA</sup>	76,53 <sup>aA</sup>
25	22,80 <sup>bcA</sup>	22,58 <sup>bcA</sup>	76,65 <sup>abA</sup>	76,74 <sup>abA</sup>

Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

**Tabela 14** - Parâmetros de cromaticidade CIELCh para mexilhões fêmeas

Tempo (dias)	C* Fêmea		h Fêmea	
	Gás	Controle	Gás	Controle
0	61,36 <sup>aA</sup>	61,13 <sup>aA</sup>	56,74 <sup>aA</sup>	56,90 <sup>aA</sup>
4	64,11 <sup>aA</sup>	63,21 <sup>aA</sup>	56,62 <sup>aA</sup>	56,41 <sup>aA</sup>
7	62,13 <sup>aA</sup>	61,14 <sup>aA</sup>	57,06 <sup>aA</sup>	57,22 <sup>aA</sup>
11	60,12 <sup>aA</sup>	63,27 <sup>aA</sup>	57,52 <sup>aA</sup>	56,58 <sup>aA</sup>
14	61,92 <sup>aA</sup>	62,31 <sup>aA</sup>	57,29 <sup>aA</sup>	56,92 <sup>aA</sup>
18	62,29 <sup>aA</sup>	63,29 <sup>aA</sup>	56,73 <sup>aA</sup>	57,00 <sup>aA</sup>
21	62,68 <sup>aA</sup>	60,73 <sup>aA</sup>	57,31 <sup>aA</sup>	57,64 <sup>aA</sup>
25	62,11 <sup>aA</sup>	62,64 <sup>aA</sup>	56,83 <sup>aA</sup>	57,32 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

**Tabela 15** - Variação de cor ( $\Delta E$ ) para mexilhões machos e fêmeas.

Tempo (dias)	$\Delta E$ Macho		$\Delta E$ Fêmea	
	Gás	Controle	Gás	Controle
0	.	.	.	.
4	2,79 <sup>aA</sup>	3,28 <sup>aA</sup>	1,65 <sup>aA</sup>	3,56 <sup>aA</sup>
7	2,76 <sup>aA</sup>	3,04 <sup>aA</sup>	3,26 <sup>aA</sup>	3,12 <sup>aA</sup>
11	3,72 <sup>aA</sup>	3,53 <sup>aA</sup>	3,69 <sup>aA</sup>	3,39 <sup>aA</sup>
14	3,24 <sup>aA</sup>	3,96 <sup>aA</sup>	3,14 <sup>aA</sup>	3,77 <sup>aA</sup>
18	5,65 <sup>bA</sup>	3,02 <sup>bA</sup>	4,59 <sup>aA</sup>	3,34 <sup>aA</sup>
21	3,42 <sup>abA</sup>	3,89 <sup>abA</sup>	3,24 <sup>aA</sup>	5,81 <sup>aA</sup>
25	4,57 <sup>abA</sup>	4,20 <sup>abA</sup>	3,11 <sup>aA</sup>	2,97 <sup>aA</sup>

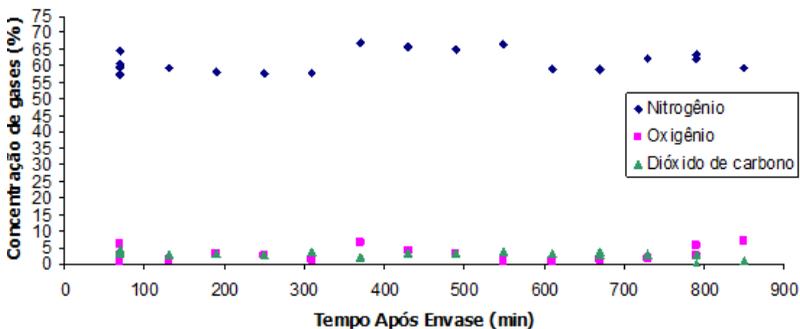
Letras minúsculas iguais entre as colunas e letras maiúsculas iguais entre as linhas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Gás: Mistura gasosa com 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

Controle: ar atmosférico

### 6.3 CARACTERIZAÇÃO DE GASES NA EMBALAGEM DO MEXILHÃO PROCESSADO

A composição gasosa encontrada no *headspace* das embalagens flexíveis não apresentou a composição gasosa esperada, e esta foi diferente desde o período inicial de análises, onde a composição inicial era de 50 % de CO<sub>2</sub> e 50 % de N<sub>2</sub>. Ocorreu variação na composição gasosa entre as embalagens e os lotes analisados. As proporções de gases aos 70 minutos tiveram variação entre 55,54 % a 72,66 % para o N<sub>2</sub>, de 0,83 % a 20,23 % para o O<sub>2</sub> e do nível “não detectado” até 3,79 % para o CO<sub>2</sub>. No decorrer do intervalo de tempo entre as análises, observou-se que os dados não indicaram uma tendência, com aumentos e decréscimos entre as proporções gasosas. A Figura 16 apresenta os resultados da análise de cromatografia gasosa realizada em dois lotes de produto envasado.



**Figura 16** - Composição gasosa de mexilhão acondicionado em embalagens flexíveis e condicionado a 3 °C.

Os resultados apresentados desde a etapa inicial das análises (70 minutos após o envase) demonstram que há deficiência no processo de envase do produto, levando-se em conta os seguintes aspectos:

- Existe a presença de O<sub>2</sub> nas embalagens, entretanto, a mistura gasosa injetada não contém esse gás, o que significa presença de ar atmosférico;
- A quantidade de CO<sub>2</sub> presente no *headspace* da embalagem é inferior à proporção injetada, conforme observado pelos resultados cromatográficos; a operação de injeção de gás é realizada sem procedimento padrão e isso pode provocar diferença no volume de gás injetado;
- Descartaram-se as embalagens flexíveis que no momento inicial de análise apresentaram composição gasosa

semelhante a do ar atmosférico (o que indica falha na operação de envase).

O mexilhão é considerado um alimento que não respira, ou seja, após a colheita e cocção não há processo metabólico ativo. Assim, os resultados esperados para este tipo de situação estariam condicionados a um envase padronizado onde a composição gasosa seria mantida e não ocorresse interação significativa com a atmosfera do ambiente.

O comportamento referenciado para este tipo de alimento é a solubilidade do  $\text{CO}_2$  na água e nos lipídeos contidos no produto, até o momento de se estabelecer o equilíbrio na proporção de  $\text{CO}_2$  dissolvido/disponível no *headspace* da embalagem (ROTABAKK et al., 2007). A proporção de  $\text{N}_2$  contida na embalagem cumpre a função de evitar o colapso da embalagem devido ao  $\text{CO}_2$  dissolvido no produto, e por este ser o mais permeável dos gases, o que resulta em contração do volume em embalagens flexíveis (ROTABAKK et al., 2008). O uso do  $\text{O}_2$  neste tipo de produto é voltado para a inibição do crescimento de bactérias estritamente anaeróbias, em proporções pequenas e suficientes para esta função (SOCCOL; OETTERER, 2003). Davis (1995) apud Soccol e Oetterer (2003) mostrou evidências de que o  $\text{O}_2$  reduz a exsudação do pescado durante o armazenamento e sugere o uso desse gás para pescado de baixo teor lipídico. Baseado nessa afirmação, sendo o mexilhão um molusco de baixo teor lipídico, a presença de  $\text{O}_2$  (desde que em pequena proporção) na mistura gasosa usada na empresa poderia ser usada como hipótese em outros estudos, levando-se em conta que o oxigênio pode ser empregado no produto com objetivos diferentes, dependendo das condições com que o produto é comercializado.

A atuação do oxigênio na conservação de mexilhões sob atmosfera modificada foi testada por Pastoriza et al. (2004), onde teores elevados de oxigênio foram utilizados em diferentes proporções com  $\text{N}_2$  e  $\text{CO}_2$  (5%  $\text{O}_2$ :20%  $\text{CO}_2$ :75%  $\text{N}_2$  ; 20%  $\text{O}_2$ :50%  $\text{CO}_2$ :30%  $\text{N}_2$ ), binário, sem  $\text{CO}_2$  (50%  $\text{O}_2$ :50%  $\text{N}_2$  e 75%  $\text{O}_2$ : 25%  $\text{N}_2$ ) e apenas  $\text{O}_2$  (100%  $\text{O}_2$ , com um vácuo parcial na zona de mistura, produzindo uma atmosfera final de 75-80% de  $\text{O}_2$ ) com a finalidade de prolongar o período de vida do mexilhão embalado vivo com atmosfera modificada e mantido sob refrigeração. Os autores obtiveram maior sobrevivência dos mexilhões com atmosferas ricas em oxigênio e pobres em  $\text{CO}_2$ , ao contrário do que se usa para aumentar vida útil de produtos susceptíveis ao crescimento bacteriano. Os melhores resultados foram obtidos com 75% de  $\text{O}_2$  e 25% de  $\text{CO}_2$ , o que estendeu a vida útil do mexilhão vivo por 48 a 72 hs após a coleta.

A atmosfera com baixos teores de oxigênio é utilizada mais comumente para produtos que respiram, como os vegetais e hortaliças prontos para consumo, onde o envase ocorre em concentrações de 3 a 5 % de O<sub>2</sub>, e o restante por CO<sub>2</sub>, nas chamadas atmosferas modificadas de equilíbrio (JACXSENS et al., 2001).

Existem outros mecanismos envolvidos na mudança da concentração de CO<sub>2</sub>, entre os quais a permeabilidade do material usado na embalagem e o potencial de absorção de CO<sub>2</sub> pelo alimento, que depende da sua composição (SIMPSON et al., 2009). A solubilidade do CO<sub>2</sub> no alimento depende ainda da temperatura, com redução desta conforme o aumento da temperatura de armazenamento (SOCCOL; OETTERER, 2003; ROTABAKK et al., 2007). As análises serviriam para detectar em quanto tempo o CO<sub>2</sub> é capaz de interagir com o produto até atingir o equilíbrio e assim concluir se a mistura gasosa interfere nas características físico-químicas das amostras.

Os resultados da composição gasosa justificam o encontrado na etapa de caracterização físico-química dos mexilhões, onde não ocorreu diferença significativa entre a atmosfera modificada e a atmosfera do ar (controle) analisadas.

A iniciativa da empresa em utilizar atmosfera modificada com o objetivo de conservar o produto é importante, desde que sejam considerados alguns aspectos para se obter um alimento seguro. Soccol e Oetterer (2003) destacam os fatores que influenciam na eficiência da mistura de gases em um produto, tais como:

- a) boa qualidade inicial da matéria-prima;
- b) boas práticas de higiene durante toda a cadeia de produção do produto;
- c) seleção do material adequado para a embalagem;
- d) equipamento com envase seguro;
- e) manutenção e controle da temperatura;
- f) escolha da proporção adequada da mistura gasosa para o produto;
- g) volume proporcional entre quantidade de gás e produto.

De acordo com essas proposições, necessita-se rever não somente o sistema de envase da empresa, mas também a qualidade da matéria-prima e as condições de processamento, a fim de avaliar o produto como um todo.

## 6.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

### 6.4.1 Microbiota do mexilhão acondicionado sob atmosfera modificada em embalagem flexível

#### 6.4.1.1 Análise no tempo inicial de armazenamento

A microbiota analisada do mexilhão pré-cozido e acondicionado sob atmosfera modificada, em embalagem do tipo flexível, após 70 minutos (tempo zero) de processamento está apresentada na Tabela 16. Inclui-se além dos micro-organismos estabelecidos pela legislação, aqueles que oferecem riscos ao produto devido à deterioração, como a *Pseudomonas* sp, por ser muito conhecida como um dos principais agentes de deterioração em alimentos.

**Tabela 16** - Contagens microbianas do tempo inicial para mexilhão *Perna perna* com injeção de mistura gasosa.

Micro-organismo	Contagem
Coliformes Totais	9,2 NMP/g
Coliformes Termotolerantes	< 3 NMP/g
Clostrídio Sulfito Redutor	< 10 <sup>1</sup> UFC/g
Estafilococos coagulase positivo	< 10 <sup>1</sup> UFC/g
<i>Pseudomonas</i> sp	< 100 UFC/g
<i>Salmonella</i> sp	Ausência

Os valores encontrados para a microbiota apresentada na Tabela 16 estão de acordo com os limites previstos para a legislação brasileira (RDC nº12, 2001) que prevê para moluscos bivalves cozidos, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados: a) Ausência de *Salmonella* sp em 25 g; b) até 10<sup>3</sup> UFC/g de estafilococos coagulase-positiva e c) 5 x 10 coliformes a 45 °C/g (BRASIL, 2001).

Cordeiro et al., (2007) encontraram contagens de coliformes totais de 0,9 NMP/g para mexilhão cozido, ausência de coliformes fecais e de *Salmonella*, 10<sup>1</sup> UFC/g de estafilococos coagulase positivo e 3,1 x 10<sup>1</sup> UFC/g de psicrotóficos.

Estudos realizados por Freitas et al. (2006) mostraram que 53,3 % dos mexilhões cozidos não atendiam à legislação específica, e concluíram que o ambiente do qual o mexilhão provém interfere na contagem microbiana, representando risco de infecções intestinais e de

contaminação cruzada de equipamentos.

A presença de coliformes serve como um indicador de sanidade do alimento, refletindo a qualidade da água de cultivo e as suas condições microbiológicas. Os efeitos da contaminação bacteriana sobre os moluscos ainda é pouco conhecido e ainda em estudo, pois é específico para cada espécie de mexilhão e a região de produção (PEREIRA et al., 2009). A presença de coliformes de origem fecal poderia ter correlação com a ocorrência de *Vibrio*, embora este último seja natural do ambiente marinho (VIEIRA et al., 1997 apud PEREIRA et al., 2009). Henriques et al. (2003, 2006, 2007) apud PEREIRA et al. (2009) tratam da possível influência da contaminação de mexilhão por coliformes no tempo de resistência do mexilhão à exposição ao ar, baixas salinidades e altas temperaturas da água. A Portaria nº 451 da Secretaria da Vigilância Sanitária (BRASIL, 1997), estabelece ausência de clostrídios sulfito-redutores em moluscos. O valor encontrado neste trabalho foi <10 NMP/g, que é o grau mínimo de detecção do método de análise. Porém, vale considerar que a presença dessa bactéria nos alimentos é uma indicação simples e rápida da potencial presença de *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*, duas espécies capazes de causar Doenças Transmitidas por Alimentos (PRATES et al., 2008).

A contagem encontrada para *Pseudomonas* sp. neste trabalho foi <100 UFC/g. Não há dados disponíveis na literatura a respeito da presença desse micro-organismo em mexilhões, de forma que são usados como referência outros produtos cárneos. Segundo resultados mostrada por Miyagusku et al. (2003) para contagem microbiológica em peito de frango, não consta na legislação brasileira um limite de crescimento de *Pseudomonas* sp para produtos cárneos. Widders et al. (1995) apud Lebert, Begot e Lebert (1998) encontraram contaminação em carcaças inteiras a 4 °C por *P. fluorescens* e *P. fragi*. Estas duas espécies agem na deterioração de produtos cárneos e lácteos através da produção de proteases extracelulares e lipases à baixas temperaturas. A ocorrência de odores indesejáveis é percebida quando a contagem encontrada atinge níveis de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> (LEBERT; BEGOT; LEBERT, 1998).

*Pseudomonas* sp., além de agente de deterioração, podem causar alteração na coloração dos alimentos, devido à sua capacidade de produzir pigmentos hidrossolúveis, que são difundidos na água livre do alimento e podem ser visualizados em diversos pontos, além do local de crescimento microbiano (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A multiplicação de bactérias deteriorantes nos mexilhões é favorecida em virtude da alta atividade de água do mesmo (0,99), enquanto que a

atividade de água mínima para o desenvolvimento desse grupo de micro-organismos é de 0,9 (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

#### 6.4.1.2 Análise microbiana durante o armazenamento

A Tabela 17 apresenta os resultados das contagens de micro-organismos psicrófilos, psicrotróficos e *Vibrio* sp realizadas ao longo de doze dias de armazenamento. Detectou-se a presença de *Vibrio alginolyticus* apenas no tempo inicial. Nos demais dias, houve ausência, mostrando que possivelmente, apenas o referido lote estaria contaminado. Por outro lado, as amostras em estudo apresentaram elevada contagem tanto de micro-organismos psicrófilos como de psicrotróficos, no sétimo dia de armazenamento. As análises cessaram no 12º dia devido à alta contagem obtida, e ao provável processo de deterioração. Este resultado mostrou a possibilidade de problemas de contaminação da matéria-prima em função da água de cultivo e do produto, devido às condições de processamento.

**Tabela 17** - Contagem de psicrófilos e psicrotróficos e presença/ausência de *Vibrio* sp no decorrer do armazenamento dos mexilhões a temperatura de 3 °C

Micro-organismo	0 dias	7 dias	12 dias
Psicrotróficos a 22°C (UFC/g)	$9,5 \times 10^4$	$5,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
Psicrófilos a 7°C (UFC/g)	$5,1 \times 10^4$	$3,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
<i>Vibrio</i> sp. (Em 25 g)	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Ausência	Ausência

A presença de psicrófilos e psicrotróficos em alimentos pode acelerar o processo de deterioração destes, e embora a contagem obtida para esses grupos de micro-organismos neste trabalho (em torno de  $10^4$  UFC/g no período inicial) seja considerada aceitável na etapa de processamento, é necessária atenção quanto às condições de estocagem desde o armazenamento até a comercialização do produto, principalmente por se tratar de um alimento que sofre ação proteolítica, tanto enzimática quanto microbiana, e que possui alta atividade de água.

A avaliação da carga microbiana permite descobrir se o produto está ou não susceptível a uma contaminação incipiente, que ocorre com uma carga de  $10^6$  UFC/g de psicrófilos e psicrotróficos. Isso significa que o alimento ainda não está deteriorado, mas está no limite para o início

desse processo. Ao ultrapassar esse limite, a degradação é muito rápida. Entretanto, a velocidade da degradação depende do tipo de alimento, e pode ocorrer dentro de um dia ou dois para alimentos perecíveis, atingindo níveis de  $10^8$  UFC/g (FRANÇA FILHO et al., 2006).

O *Vibrio* sp, em especial o *Vibrio parahaemolyticus*, está presente em peixes e frutos do mar, em quantidade inferior a  $10^3$  UFC/g, já em águas mornas a contagem atinge até  $10^6$  UFC/g. A proliferação desse micro-organismo está associada à refrigeração inadequada de frutos do mar contaminados. A cocção com temperatura maior do que  $65\text{ }^\circ\text{C}$  e resfriamento a temperatura inferior à  $5\text{ }^\circ\text{C}$  após a coleta são suficientes para seu controle. O isolamento de qualquer espécie de *Vibrio* a partir de produtos cozidos indica práticas inadequadas de higiene, o que pode ter ocorrido de forma isolada nas amostras de mexilhão estudadas neste trabalho, onde o *Vibrio alginolyticus* foi encontrado. Esse micro-organismo é destruído rapidamente pelo calor, portanto o monitoramento das práticas de higiene após o cozimento elimina esse problema (FORSYTHE, 2002).

Caglak et al. (2008) estudaram o armazenamento de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* em atmosfera modificada e quantificaram bactérias psicrotróficas, bactérias ácido lácticas e a contagem total de micro-organismos, para 5 atmosferas diferentes: embalagem a vácuo, ar atmosférico e atmosfera modificada com proporções de 50 %  $\text{CO}_2$  / 50 %  $\text{N}_2$ , 80 %  $\text{CO}_2$  / 20 %  $\text{N}_2$ , 65 %  $\text{CO}_2$  / 35 %  $\text{N}_2$ , armazenadas a temperatura de  $2 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ . Todas as contagens aumentaram com o decorrer do período de armazenamento de 12 dias, porém na atmosfera modificada o crescimento foi reduzido aos mexilhões armazenados em vácuo, e a mistura de gases com a qual foi obtida maior vida útil foi de 80 %  $\text{CO}_2$  / 20 %  $\text{N}_2$ , com mais de 8 dias de armazenamento.

Goulas et al. (2005) estudaram o armazenamento de mexilhões em atmosfera modificada, vácuo e ao ar, e analisaram o crescimento de *Pseudomonas* sp e clostrídio sulfito redutores, onde os menores valores de crescimento ao longo de 15 dias foram obtidos para a atmosfera com 80 %  $\text{CO}_2$  / 20 %  $\text{N}_2$  e com vácuo, com valores de 6,8 log UFC/g para *Pseudomonas* sp e para Clostrídio Sulfito redutores, respectivamente. O valor inicial de *Pseudomonas* foi de 3,5 log UFC/g, e obteve 11 a 12 dias de vida útil com a atmosfera 50 %  $\text{CO}_2$  / 50 %  $\text{N}_2$  e 40 %  $\text{CO}_2$  / 30 %  $\text{N}_2$  / 30 %  $\text{O}_2$ , 14 a 15 dias para 80 %  $\text{CO}_2$  / 20 %  $\text{N}_2$ , 10 a 11 dias para vácuo e 8 a 9 dias para o controle, com armazenamento a temperatura de  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

Alguns grupos de micro-organismos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Photobacterium*, membros da família *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido-lácticas atuam na degradação de

frutos do mar agindo na descarboxilação de aminoácidos, o que resulta na geração de aminas biogênicas que são indicadoras de deterioração do produto (ERKAN, 2005).

Um estudo mais aprofundado da microbiota presente nesse tipo de produto é necessário, visto que as interações entre os micro-organismos podem induzir ou inibir o desenvolvimento de determinado tipo de contaminante, em virtude de modificação do meio, por aumento ou diminuição do pH ou pela presença de metabólitos. No caso de pescado, sabe-se que a produção de aminas e outros compostos alcalinos aumentam o pH, e com isso viabilizam o desenvolvimento de bactérias que anteriormente seriam inibidas pelo pH mais baixo (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Fenômeno semelhante pode ocorrer no mexilhão, e essa interação entre as condições do produto e os micro-organismos que são inibidos e/ou se desenvolvem ao longo do período é um dado importante para controle de qualidade e para atingir outros objetivos, como uma vida útil mais prolongada.

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior (itens 6.4.1.1 e 6.4.1.2) realizou-se os estudos subsequentes com os resultados apresentados a seguir:

#### **6.4.2 Avaliação microbiológica da água de processamento do mexilhão**

A contagem microbiana de coliformes a 35 °C, estafilococos coagulase positivo, *Salmonella* spp e clostrídio sulfito-redutores do gelo utilizado no processamento, das águas envolvidas nas Fases I, II e III estão apresentadas na Tabela 18.

Os resultados das análises microbiológicas para a água utilizada nas diversas etapas do processamento e para o gelo indicam que estes não atendem aos requisitos da Legislação para água natural e água mineral natural, na fonte ou comercializada, através da Resolução nº 54/2000 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2000) no que se refere à contagem de coliformes a 35 °C, que deve ter ausência do referido grupo em 100 mL de amostra indicativa. Os demais parâmetros referidos pela Resolução estabelecem o limite de <1 UFC para clostrídios sulfito-redutores e ausência de *Vibrio* sp.

**Tabela 18** - Contagem de coliformes, estafilococos coagulase positiva, presença/ausência de *Salmonella* sp e de clostrídio sulfito-redutores nas águas do processamento de mexilhão

ÁGUA DE PROCESSAMENTO	CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS			
	Coliformes a 35 °C (NMP/100 mL)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/100 mL)	<i>Salmonella</i> spp (em 100 mL)	Clostrídio sulfito-redutores a 46 °C (UFC/100 mL)
Fase I: Lavagem dos mexilhões	$2,1 \times 10^1$	< 1	Ausência	$1,1 \times 10^2$
Fase II: Resfriamento após a cocção	$9,2 \times 10^2$	<1	Ausência	<1
Fase III: Resfriamento após desconchamento	$2,2 \times 10^2$	<1	Ausência	$3,0 \times 10^1$
Fase II e III: Gelo	1,1	<1	Ausência	<1

As águas em todas as fases do processamento apresentaram problemas de contaminação microbiológica, particularmente quanto à contagem de coliformes a 35 °C, psicrotróficos e psicrófilos. Embora os valores de estafilococos coagulase positivo encontrados neste trabalho sejam inferiores ao limite de detecção (< 1 UFC/100 mL) e apresente ausência de *Salmonella* spp, um dos critérios que esteja acima dos estabelecidos pela Legislação é suficiente para condenar a qualidade microbiológica da água. A Portaria nº 518, de 2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) prevê que a qualidade da água em contato com alimentos no processamento tenha padrões equivalentes ao da água potável, visto que esta é uma fonte de recontaminação em potencial. A mesma portaria estabelece ainda que em 100 mL de água deve-se ter ausência de coliformes a 35 °C. A Resolução nº 54/2000 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera clostrídios sulfito-redutores como indicadores de contaminação em águas minerais e naturais (BRASIL, 2000).

Os resultados deste trabalho para a análise da qualidade das águas por grupo de micro-organismos presentes mostrou dados preocupantes. As maiores contagens de coliformes a 35 °C foram encontradas na água dos tanques de resfriamento I e II (Fase II e III, respectivamente) com valores na ordem de  $10^2$  NMP/100 mL de água. Por se tratar de água que entra em contato com os mexilhões, esta se torna um veículo de

recontaminação da matéria-prima. A presença de coliformes não é desejável, e isto pode ser justificado pelo fato de que essa água é usada continuamente para lavagem durante a produção. A microbiota presente na água de lavagem (Fase I - Tabelas 18 e 19) é, provavelmente, combinação da microbiota típica da água salgada que é utilizada e do mexilhão coletado no mar, que traz consigo micro-organismos típicos do ambiente de cultivo. Nesta etapa, a água utilizada para lavagem é salgada e de origem estuarina. Águas oriundas dessas regiões oferecem risco à saúde humana associada com o consumo de bivalves cultivados em água contaminada por esgotos humanos e resíduos animais. (CAMPOS; CACHOLA, 2007). A água do mar é usada na remoção das sujidades das conchas na primeira lavagem (Fase I – Lavagem dos mexilhões) o que dificulta a padronização dos resultados quanto às contagens microbianas, principalmente para coliformes totais devido à variabilidade do despejo de esgotos e resíduos nos estuários (NEILL, 2004). Assim, a contagem obtida na primeira fase não pode ser comparada com as demais, devido ao uso de água tratada nas etapas seguintes.

Embora a enumeração de coliformes a 35°C em água, conforme realizado neste trabalho seja menos representativa como indicação de contaminação fecal, as indústrias alimentícias utilizam esse parâmetro como indicadores de poluição na pré-sanitização, contaminação pós-sanitização ou pós-processo, como um alerta às condições das práticas de higiene e de sanitização, se estão de acordo ou não com os padrões requeridos para o processamento de alimentos (GALVÃO, 2004).

A presença de coliformes a 35 °C em água potável pode indicar a presença de patógenos entéricos potenciais como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Vibrio cholerae* (DA SILVA et al., 2008). A informação obtida neste trabalho permitiu detectar contaminação por este micro-organismo, entretanto, outras investigações mais deverão ser realizadas.

Quanto às amostras de gelo estudadas no presente trabalho, as mesmas apresentaram não conformidade em relação à contagem de coliformes a 35 °C (1,1 NMP/100 mL de água) quanto aos padrões de qualidade segundo a Portaria GM/MS nº 518 de 25/03/2004 DOU 26/03/2004 (BRASIL, 2004) e Resolução RDC nº 274 de 22/09/2005 – ANVISA/MS (BRASIL, 2005). O resultado obtido confirma a tendência da falta de qualidade microbiológica existente no gelo comercializado no Brasil, conforme já visto em outros estudos (FELDHUSEN, 2000; SHABARINATH et al., 2007; GIAMPIETRO; REZENDE-LAGO, 2009).

A presença de coliformes encontrada nesse trabalho é compatível com os estudos realizados por Giampietro e Rezende-Lago (2009)

analisaram a qualidade microbiológica em gelo utilizado para resfriamento de pescado e encontraram em 96,7 % das amostras contaminação por coliformes totais. De acordo com a legislação, a água usada para fabricação de gelo deve ter ausência de coliformes em 100 mL de água analisada (BRASIL, 2004).

O Centro Nacional de Vigilância Sanitária, através da Secretaria da Saúde RDC nº 216 (BRASIL, 2004) preconiza alguns parâmetros de qualidade para o gelo destinado ao consumo humano ou que entre em contato com alimentos. Para tal, o gelo deverá ser fabricado a partir de água que atenda ao padrão de potabilidade estabelecido, sendo cloro residual livre entre 0,5 e 2,0 ppm; pH de 6,0 a 9,5; turbidez menor que 2,0 NTU; contagem de mesófilos de no máximo  $5,0 \times 10^2$  UFC/mL e ausência de coliformes/100 mL de água analisada (GIAMPIETRO; REZENDE-LAGO, 2009).

Mendes (2009) estudou a qualidade microbiológica do gelo e constatou que 26 % das amostras estavam com qualidade imprópria para consumo. As bactérias coliformes estavam presentes em 83 % das amostras com não-conformidade. A autora acrescenta ainda que os padrões microbiológicos estabelecidos para o gelo são semelhantes aos de outros países, onde não existem critérios específicos para avaliação da qualidade do gelo em si, e os limites utilizados são os idênticos aos padrões da água para consumo.

O gelo utilizado no beneficiamento deve ser verificado quanto ao seu acondicionamento, bem como sua procedência. As recomendações para o gelo utilizado no beneficiamento de pescado é que este seja produzido com água potável da melhor qualidade, com registro em órgão competente, com transporte e manuseio dentro dos padrões sanitários. O gelo sujo, fabricado com água não potável e de procedência desconhecida não servem para conservar o pescado. A reutilização do gelo não deve ocorrer, principalmente se teve contato anterior com o pescado ou com superfícies contaminadas (PÉREZ et al., 2007).

A FUNASA (Fundação Nacional da Saúde), por meio da Portaria nº. 1469, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2000) estabelecem apenas a ausência de coliformes e indica que, no caso de presença destes, que sejam investigados a presença de *Escherichia coli* e termotolerantes, com verificação e confirmação dos resultados positivos.

A contagem de estafilococos coagulase positiva apresentou-se menor que 1 UFC/100 mL para todas as etapas. Esse valor pode ser considerado não significativo na qualidade da água, visto que a Legislação não prevê limites para esse micro-organismo. Esse tipo de

análise é importante devido ao fato dos estafilococos encontrarem-se largamente distribuído no meio ambiente e ter como *habitat* a pele, as glândulas e membranas mucosas, o trato intestinal do homem e dos animais, vinculando à contaminação por manipulação inadequada, e por isso, esse parâmetro deve ser sempre investigado. Das 32 espécies de *Staphylococcus*, cinco são produtoras de coagulase, sendo definidas como coagulase positivas (CUNHA et al., 2005).

A literatura não referencia a presença de estafilococos coagulase positiva em águas de uso industrial de pescado e derivados. Desmarchelier et al., (1999) estudaram a presença do gênero *Staphylococcus* spp em processo de abate de bovinos e analisaram a água de lavagem dos bovinos, bem como coleta do ar e das carcaças. Isolaram a partir das amostras de água, sete produtores de coagulase positiva. Porém, nas etapas de lavagem dos pés na entrada da plataforma da evisceração não foi encontrada a presença de *Staphylococcus* spp. Os autores sugeriram que as práticas de lavagem não são suficientes para controlar o grupo coagulase positivo em um abatedouro bovino, tendo em vista os resultados obtidos, que foi a presença de estafilococos coagulase positiva na água e transporte dos micro-organismos nas mãos dos trabalhadores, bem como nas carcaças de bovinos.

O pequeno número de estafilococos coagulase positiva encontrado na água não oferece preocupação neste estudo, embora o produto possa ser contaminado pela água nos tanques de resfriamento, os mexilhões são submetidos a tratamento térmico e depois armazenados sob refrigeração a 3 °C, que é uma temperatura abaixo da mínima requerida para o crescimento de *Staphylococcus* spp ,em torno de 8 a 9 °C, e não indica necessariamente que esses produtos possam causar uma intoxicação com uma contagem dessa magnitude (NORMANNO et al., 2005; CUNHA NETO; SILVA e STAMFORD, 2002).

O controle de *Staphylococcus* spp pode ser realizado perante o cumprimento dos padrões de higiene e sanidade, com cuidado especial na manipulação da água envolvida no processo bem como dos produtos, e alimentos já cozidos devem ser imediatamente refrigerados a temperaturas inferiores a 7 °C (NORMANNO et al., 2005).

A água e o gelo do processamento do mexilhão apresentaram ausência de *Salmonella* sp. (Tabela 18), o que atende ao exigido pela RDC 54/2000 da Agência de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2000). A ausência desse micro-organismo na água é importante, para que não ocorra contaminação do produto durante o seu processamento, nas etapas de lavagem e resfriamento. Segundo Feldhusen (2000) contagens

na ordem de  $10^2$  UFC/g são suficientes para causar infecção.

A possibilidade de contaminação de alimentos por *Salmonella* spp no processamento pode ocorrer no caso de suprimento insuficiente de água limpa, tratamento sanitário inadequado, falta de higiene e de controle da segurança alimentar (SHABARINATH et al., 2007).

A presença do gênero *Salmonella* em corpos hídricos e sua relação com as bactérias coliformes de origem fecal foram detectadas em alguns estudos, onde se constatou que, em águas sem poluição e águas de estuário poluídas, um acentuado aumento na detecção de salmonelas quando os números mais prováveis (NMP) de coliformes fecais atingiam níveis superiores a 200 NMP/100 mL de água (SOUZA, IARIA e PAIM, 1992). Neste caso, a presença de coliformes fecais nas águas de processo não estão relacionados à *Salmonella*, visto que houve ausência desta nas análises realizadas.

Os clostrídios sulfito redutores apresentaram contagens de  $1,1 \times 10^2$  UFC/100 mL para água de lavagem (Fase I) e de  $3 \times 10^1$  UFC/100 mL para água de resfriamento do tanque II (Fase III – Tabela 18). Esses resultados podem ser resultantes de: a) deficiências na manipulação durante o desconchamento; b) uso contínuo da água e gelo sem trocas periódicas; c) a temperatura ambiente no local de processamento (sem controle e não refrigerado, com  $\pm 25$  °C em média no inverno e  $\pm 32$  °C no verão) que pode viabilizar a multiplicação microbiana na água e nos mexilhões.

A Resolução nº 54/2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o limite de  $<1,0$  UFC de clostrídios sulfito-redutores em 100 mL de água natural e/ou mineral. Considerando esse critério, apenas a água de resfriamento e o gelo estão de acordo com a legislação. Sendo assim, o produto oriundo da lavagem da Fase I poderá contaminar a água de resfriamento, caso não haja destruição dessa carga microbiana na etapa do tratamento térmico. E, conseqüentemente dos lotes subseqüentes que serão imersos para resfriamento, utilizando a mesma água.

A identificação de Clostrídios sulfito-redutores em água é útil como indicador de contaminação fecal na ausência de outros indicadores, como a *E. coli*, e a sua incidência no meio aquático é atribuída à presença de dejetos humanos (GALVÃO, 2004).

A Tabela 19 apresenta a contagem de psicrotóxicos, psicrófilos e de *Vibrio* sp para as águas envolvidas no processamento de mexilhão.

**Tabela 19** - Contagem de psicrotróficos, psicrofílos e *Vibrio* sp para as águas envolvidas no processamento de mexilhão

ÁGUA DE PROCESSAMENTO	CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS		
	Psicrotróficos a 22°C (UFC /100mL)	Psicrofílos a 7°C (UFC/100 mL)	<i>Vibrio</i> sp (100 mL)
Fase I: Lavagem dos mexilhões	$1,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	Presença de <i>V. parahaemolyticus</i>
Fase II: Resfriamento após a cocção	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	Presença de <i>V. parahaemolyticus</i>
Fase III: Resfriamento após desconchamento	$> 2,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	Ausência
Fase II e III: Gelo	$5,8 \times 10^2$	$6,2 \times 10^1$	Ausência

As águas de lavagem (Fase I) e dos tanques de resfriamento apresentaram contagem de psicrofílos e psicrotróficos entre  $10^4$  a  $10^5$  UFC/100 mL, respectivamente. Os limites para a presença desses grupos de micro-organismos em água não é estabelecido pela Legislação, mas o seu estudo é essencial pelo fato de que a água, dependendo da procedência e das suas condições, pode se tornar um transmissor em potencial, proveniente de sua própria carga microbiana, conseqüente do contato direto e/ou indireto com os alimentos durante o processamento.

Os resultados para as análises microbiológicas de psicrotróficos e psicrofílos (Tabela 19) demonstram que a qualidade microbiológica do gelo é inadequada. As contagens de psicrofílos e psicrotróficos encontrado na ordem de  $10^2$  UFC/ 100 mL de água. Giampietro e Rezende-Lago (2009) encontraram valores muito elevados de psicrotróficos no gelo, entre  $10^4$  a  $10^7$  UFC/mL. Falcão et al., (2002) estudaram qualidade microbiológica de gelo usado para refrigerar pescado e frutos do mar e encontraram contagens de psicrotróficos em todas as amostras analisadas, com valores entre  $1,5 \times 10^1$  e  $3,1 \times 10^3$  UFC/mL. O valor encontrado neste trabalho são semelhantes aos obtidos por esses autores.

A Legislação Brasileira não estipula limites para o grupo dos psicrofílos e psicrotróficos em água ou gelo. Para contagem de

psicrófilos a 22 °C não há padrão estabelecido, conforme Diretiva 98/83 do Conselho CE de 03/11/1998 (BRASIL, 1998). A presença desse grupo de micro-organismos serve como indicativo do grau de deterioração dos alimentos (CUNHA, 2006).

*Vibrio parahaemolyticus* foi detectado na água das Fases I e II do processamento. Algumas considerações devem ser feitas em relação a situação da Fase I, pois o *Vibrio sp* é proveniente da microbiota natural da água marinha, e a água utilizada no tanque para a lavagem das conchas é água salgada. Algumas condições da água salgada podem determinar a ocorrência ou não de *Vibrio sp.*, tais como a temperatura da água, a salinidade e também a proveniência dessa água. *Vibrio sp* é encontrado com menos frequência quando a temperatura da água é baixa e a salinidade alta. A interação desses fatores com o teor de oxigênio dissolvido da água é difícil de ser estabelecido (CAVALLO; STABILI, 2002). Assim, a presença de *Vibrio sp* na água analisada pode ser proveniente do mexilhão ou à própria água salgada usada para a lavagem.

A presença de *Vibrio sp* no tanque de resfriamento I (Fase II), após tratamento térmico da matéria-prima, coloca em questionamento as boas práticas de higiene da empresa, e do processo de cocção e da água de resfriamento. A sua presença na água de resfriamento pode ser atribuída ao contato do produto com a água e a troca não freqüente da mesma.

A contaminação de alimentos durante o processamento através das águas oriundas de tanques de lavagem é um problema que ocorre com outros produtos cárneos, conforme estudado por Pereira et al., (2008), que avaliaram e estudaram a microbiota da água de escaldagem de frangos e relatam que as condições das águas desse tipo de tanque podem ser alteradas pela contaminação microbiana que é apresentada pelo animal envolvido no processamento.

A melhoria da qualidade da água de beneficiamento dos mexilhões é uma prioridade para correção das deficiências apresentadas pelo produto final. Não basta que a água adicionada aos tanques no início das atividades esteja de acordo com o padrão, mas sim que a avaliação e manutenção da qualidade seja realizada por monitoramento de pH, cloração e condições de turbidez da água, além da limpeza e desinfecção dos tanques antes e após o processamento ao final de cada turno.

A água do mar usada em tanques, ambientes naturais ou nas balsas deve ser apenas água limpa, com salinidade adequada e parâmetros físico-químicos que permitam a função normal de seu

metabolismo após a coleta. Essas características variam entre o local de coleta e o molusco envolvido, segundo o CAC-RCP 52 (2006), do *Codex Alimentarius*.

O cloro livre é um fator importante das águas utilizadas no processamento de alimentos. As indústrias utilizam proporções de 2 a 15 ppm de cloro livre nas diversas etapas para o abate de aves, suínos e bovinos, além da higienização dos equipamentos, que ocorre a 20 ppm, o que reduz de 78 % a 90 % das contagens bacterianas, respectivamente (PEREIRA et al., 2008). Por isso, deve haver um controle do teor de cloro livre na água dos tanques e de lavagem para assegurar a eficiência do processo. O controle do pH da água clorada é outro indicativo do teor de cloro livre e da presença de metabólitos na água como elemento contaminante.

O conjunto dos resultados apresentados não era esperado, tendo em vista que a empresa em estudo possui um PPHO (Procedimento Padrão de Higiene Operacional) para potabilidade da água e do gelo. O referido PPHO segue documentos de referência no Ministério da Saúde e da ANVISA, como:

- Portaria n.º 1428/MS, de 26 de novembro de 1993.
- Portaria SVS/MS n.º 326, de 30 de julho de 1997.
- Resolução RDC n.º 275, 21 de outubro de 2002.
- Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004.
- Instrução Normativa N.º 62, de 26 de agosto de 2003.

Estas normas são aplicadas para a água de abastecimento utilizada na indústria, como a manutenção e higienização da caixa d'água e da cisterna, controle do teor de cloro e da potabilidade da água e do gelo. Ainda descreve medidas de monitoramento, ações preventivas e corretivas. Neste estudo, foi verificado que a empresa descreve no PPHO que a mesma mantém o cloro livre a 5 ppm para a água empregada na fabricação do gelo, limpeza em geral e diretamente nos produtos, através da lavagem e resfriamento dos mesmos. O artigo 13 da Portaria MS n.º 518/2004 (BRASIL, 2004) exige que após a desinfecção a água contenha um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L, sendo obrigatória a manutenção, de no mínimo, 0,2 mg/L em qualquer ponto da rede de distribuição. Recomendando-se que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 a tempo de condição definida no referido artigo. Baseado nos resultados obtidos, a empresa em questão não faz o monitoramento corretamente dos níveis de cloro e pH da água, como regulamenta a Legislação. Por isso, faz-se imprescindível a revisão do

PPHO e a fiscalização dos procedimentos de controle, além do treinamento de funcionários envolvidos no processo. A eficiência dessas medidas devem ser verificadas com novas análises microbiológicas da água e do produto quanto a presença ou ausência de *Vibrio*.

Não foram encontrados na literatura estudo de processos na área de pescado. A área mais explorada é no processamento de carcaças de frango, onde a carga microbiana da água em contato com alimentos tem sido estudada em frangos. Rodrigo et al. (2005) estudaram a quantidade e a qualidade da água de lavagem no processamento de carcaças de frango e apontaram a contaminação cruzada como o principal fator que aumenta a carga microbiana das carcaças, ainda que a lavagem com água tenha o objetivo de redução da carga microbiana. Os microorganismos encontrados com maior frequência foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp e *Campylobacter*. A imersão só é usada em casos onde a água é de qualidade e em abundância, o que contraria o sistema de resfriamento de imersão dos mexilhões, onde a troca ineficiente de água potencializa o acúmulo de proteína e de líquidos, aumentando o crescimento microbiano.

#### **6.4.3 Avaliação microbiológica do mexilhão durante as etapas do processamento**

Os resultados das análises microbiológicas no decorrer do processamento do mexilhão cozido e resfriado estão apresentados nas Tabelas 20 e 21.

A contagem para coliformes a 35 °C das amostras de mexilhão, ao longo do processamento apresentou os seguintes resultados: aumentou de 3,6 NMP/g (Fase I- *in natura*) para  $4,6 \times 10^2$  NMP/g (Fase III(b) - Tabela 20 – amostra final). Como as amostras eram do mesmo lote, coletadas em pontos diferentes, este resultado indica que pode ter ocorrido contaminação após a cocção nas etapas de manipulação e resfriamento dos mexilhões.

Nos trabalhos disponíveis na literatura (Galvão 2004) para mexilhão *in natura* a contagem para coliformes a 35 °C está na ordem de  $2,5 \times 10^1$  NMP/g a  $2,3 \times 10^3$  NMP/g, acima dos encontrados no presente estudo (3,6 NMP/g de coliformes). A Legislação estabelece o limite de até  $3 \times 10$  NMP/g de amostras para moluscos bivalves *in natura* (BRASIL, 2001). Segundo Huss (2000) a Legislação espanhola, através do Boletín Oficial del Estado (BOE) – na Espanha - nº 308/1993, estabelecem limites para coliformes fecais de  $<300/100g$ ; E.

*coli* <230/100g e ausência de *Salmonella* spp em 25 g. As normas da Legislação Europeia que controlam a qualidade sanitária da produção comercial de moluscos bivalves, estabelece o padrão para o produto final de  $3 \times 10^2$  coliformes fecais/100 g de bivalves (frescos e líquido intravalvular) para bivalves vivos comercializados no mercado (CAMPOS; CACHOLA, 2007).

**Tabela 20** - Contagem de coliformes a 35 °C, estafilococos coagulase positiva, presença/ausência de *Salmonella* sp e de clostrídio sulfito-redutores e para o mexilhão *Perna perna* nas diversas etapas de processamento

MEXILHÃO NO PROCESSAMENTO	MICRO-ORGANISMOS			
	Coliformes a 35°C (NMP/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp (presença/ ausência em 25g)	Clostrídio sulfito- redutores a 46°C (UFC/g)
Fase I: <i>In natura</i>	3,6	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$8,0 \times 10^1$
Fase II (a): Cozido na casca sem resfriamento (indústria)	$< 3$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,0 \times 10^1$
Fase II (a): Cozido na casca sem resfriamento (laboratório)	$< 3$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
Fase II (b): Cozido na casca com resfriamento	$< 3$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
Fase III (a): Desconchado sem resfriamento	$4,3 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
Fase III (b): Desconchado com resfriamento	$4,6 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$

O *Codex Standard* (292/2008) estabelece um padrão para moluscos bivalves comercializados *in natura* onde são recomendadas medidas para higiene e manipulação, além de padrões microbiológicos, e recomendam a análise de *Escherichia coli* como micro-organismo indicador para coliformes (limite de 700 *E. coli*/100g) e de *Salmonella* spp, (ausência em 25g de produto). O mesmo documento relata a importância dos moluscos estarem aptos para consumo humano, e o

processamento térmico destes visa a redução da população microbiana para consumo seguro.

Para a bactéria *Estafilococos* coagulase positiva, a contagem manteve-se a mesma durante todas as fases ( $<1,0 \times 10^1$  UFC/g) do processamento. O limite imposto pela Legislação (BRASIL, 2001) é de até  $10^3$  UFC/g de estafilococos coagulase positiva para moluscos bivalves. Portanto, quanto a esse critério, as amostras estão dentro dos limites estabelecidos.

Quanto a *Salmonella* spp, houve ausência em todas as etapas. Esse micro-organismo não faz parte da microbiota natural de moluscos e crustáceos, mas pode ser incorporada a estes em virtude do contato com água contaminada ou por manipulação inadequada após a captura (JACABI et al. 1999, apud FARIAS, 2006). Os resultados (Tabela 20) demonstram que incidência desse micro-organismo não é problema no produto avaliado no presente trabalho. A incidência de *Salmonella* spp em frutos do mar é mais alta em países do Pacífico Central e da África (12 %), e mais baixa na Europa (2 %), incluindo a Rússia e América do Norte (PONCE et al., 2008). Fatores como a deposição de dejetos na água, bem como a temperatura desta influenciam a presença desse micro-organismo. No Brasil a incidência de *Salmonella* spp em frutos do mar não é possível ser determinada com exatidão, pois apenas 10 % do total de casos de surto alimentar são notificados no Brasil, além da dificuldade em detectar o diagnóstico (SHINOHARA et al., 2008).

Andrade et al., (2009) estudaram a qualidade microbiológica de ostras *in natura* e encontraram resultados para estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp dentro dos padrões microbiológicos previstos. Os coliformes totais apresentaram valores acima do limite de  $5 \times 10$  NMP/g em 83,3 % das amostras. Os autores concluíram que as ostras analisadas encontravam-se em padrão microbiológico indesejável para consumo humano, devido à presença de colônias características de *V. vulnificus*, patogênicas ao homem, obtidas através de testes bioquímicos, e Coliformes totais e termotolerantes nas amostras comercializadas na praia de Boa Viagem, Recife – PE, durante o período de dezembro de 2008 a maio de 2009.

Ribeiro et al., (2009) confirmam que o pescado é um veículo muito menos frequente de *Salmonella* spp do que outros produtos, sendo o peixe e os mariscos responsáveis apenas por uma pequena percentagem do número total de casos de *Salmonella* spp. notificados nos Estados Unidos e em outros países. Assim, o principal veículo alimentar de salmoneloses é o frango (RUSUL et al., 1996).

O comportamento de Clostrídio Sulfito-redutores a 46 °C

(UFC/g) foi de redução desde a Fase I até a Fase II (b) e na Fase III (Tabela 20) manteve-se com  $<1,0 \times 10^1$  UFC/g. Galvão (2004) obteve valores entre  $1,0 \times 10^1$  UFC/g e  $2,2 \times 10^2$  UFC/g, semelhantes aos obtidos neste trabalho. A Portaria nº 451 da Secretaria da Vigilância Sanitária, por Brasil (1997) prevê ausência de clostrídios sulfito-redutores em moluscos, pois ele é um indicador de contaminação fecal.

A Tabela 21 mostra os resultados para contagem do micro-organismos psicrófilos, psicrotróficos e *Vibrio* sp, para mexilhões processados na indústria e no laboratório. Para as amostras processadas na indústria (Fases de I a III) apresentou os seguintes resultados: presença de psicrotróficos e psicrófilos na ordem de  $10^3$  e  $10^2$  UFC/g, respectivamente (Fase I). Nas fases II e III, a contagem de psicrotróficos e psicrófilos estão na ordem de  $< 10^2$ , das amostras sem o desconchamento e houve um aumento para  $10^4$  dos psicrotróficos e na ordem de  $10^3$  de psicrófilos, para as amostras após o desconchamento e resfriamento, na mesma Fase. As oscilações observadas nos resultados apresentados são provenientes, provavelmente, das diferenças na carga microbiana das amostras, mesmo sendo do mesmo lote. Salienta-se que durante a fase de processamento há diferença no tempo de espera entre as etapas, o que poderia provocar também mudanças nas atividades enzimáticas do produto tendo como consequência aumento de sua carga microbiana.

Quanto ao *Vibrio* sp observa-se que este esta presente em todas as amostras processadas na empresa (Tabela 21), exceto para a Fase II, imediatamente após a cocção. Este resultado mostra que houve contaminação do produto durante o processamento na indústria, após essa etapa, que foi provocada, provavelmente, pela água de resfriamento. Para as amostras processadas utilizado sistema de cozimento montado no Laboratório, autoclave hermética, todas as amostras estão de acordo com a Legislação brasileira vigente.

A Legislação atual não estabelece valores limites para o crescimento de psicrófilos e psicrotróficos em alimentos, porém a presença desse tipo de micro-organismo serve como referência para mostrar a capacidade de deterioração microbiana de pescado, por exemplo, através de processos proteolíticos, que reduz a sua vida útil, mesmo a baixas temperaturas (SANTOS, 2006). O mesmo autor encontrou contagens de psicrotróficos entre  $10^4$  e  $10^6$  UFC/g, para peixe fresco, conhecido como piramutaba no norte do País. Esses resultados foram associados a uma elevação do pH e concluiu-se que a microbiota psicrotrófica interfere nos mecanismos de deterioração.

**Tabela 21** - Micro-organismos psicrotróficos, micro-organismos psicrófilos e *Vibrio* sp encontrados para o mexilhão *Perna perna* nas diversas etapas de processamento

MEXILHÃO NO PROCESSAMENTO	CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS		
	Psicrotróficos a 22°C (UFC/g)	Psicrófilos a 7°C (UFC/g)	Presença/ ausência <i>Vibrio</i> sp (25 g)
Fase I: <i>In natura</i>	1 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	Presença de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. alginolyticus</i>
Fase II (a): Cozido na casca sem resfriamento (indústria)	<1,0 x 10 <sup>2</sup>	<1,0 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
Fase II (a): Cozido na casca sem resfriamento (laboratório)	2,0 x 10 <sup>2</sup>	<1,0 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
Fase II (b): Cozido na casca com resfriamento	3,0 x 10 <sup>2</sup>	<1,0 x 10 <sup>2</sup>	Presença de <i>V. alginolyticus</i>
Fase III (b): Desconchado sem resfriamento	2,0 x 10 <sup>4</sup>	7,6 x 10 <sup>3</sup>	Presença de <i>V. parahaemolyticus</i>
Fase III (b): Desconchado com resfriamento	2,7 x 10 <sup>4</sup>	9,9 x 10 <sup>3</sup>	Presença de <i>V. alginolyticus</i>

Segundo FRANÇA FILHO et al., (2006) em geral, o início da deterioração incipiente em alimentos se dá quando a contagem microbiana atinge níveis maior ou igual a 10<sup>6</sup> UFC. A partir desse valor, as reações de deterioração são potencializadas e o produto perde a sua qualidade em um curto período de tempo.

Huss et al., (2000) em estudo sobre perigos e riscos para frutos do mar, destacam que os produtos resfriados devem ser aquecidos em embalagens hermeticamente fechadas, fora de contato com outros agentes para evitar recontaminação, visando eliminar a sobrevivência de psicrotróficos patógenos.

Stokes (1966) apud Bandeira (2004) relata que a incidência de psicrófilos em carne é alta, onde esse grupo pode representar até 93 % da microbiota total em carnes. A contaminação por esse grupo de micro-organismos pode ocorrer principalmente no cultivo, durante a captura, processamento, distribuição e armazenamento (VENUGOPAL, 2002).

A proliferação dos psicrófilos é viabilizada pela exposição do produto a baixas temperaturas, e esta é percebida pela produção de odores desagradáveis e limosidade sobre as carnes refrigeradas (BANDEIRA, 2004). Neste trabalho, foi possível observar visualmente

que durante o período de armazenamento, um aumento na produção de odores e certa limosidade na superfície dos mexilhões.

A presença de *Vibrio* sp verificada no presente trabalho, merece atenção, em relação à espécie *Vibrio parahaemolyticus*. O grau de contaminação desta bactéria em frutos do mar *in natura* está relacionado com a temperatura das águas de cultivo (SU; LIU, 2007). Em relação ao produto cozido e resfriado, esperava-se que o *Vibrio* sp fosse eliminado na cocção, pois estes são facilmente destruídos pelo calor e o processo deve ser suficiente para sua eliminação (JAKSIC et al., 2002).

Existem riscos associados ao consumo de bivalves com *Vibrio parahemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, quando estes são submetidos a um tempo de cocção insuficiente para eliminá-los e são consumidos (NORMANNO et al., 2006). A explicação para isso está nos fatores de virulência do micro-organismo, associado a dois tipos de hemolisinas, embora parte do *Vibrio parahaemolyticus* isolado do ambiente marinho não seja necessariamente patogênico (SU; LIU, 2007). O *Vibrio* sp do produto será eliminado se submetido a um novo tratamento térmico. Em relação à presença do *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus* nos mexilhões após a cocção presentes nas amostras estudadas, pode ser atribuída à qualidade da água utilizada nas etapas de resfriamento, onde pode ocorrer reincorporação de micro-organismos, que foram eliminados na cocção, conforme resultados apresentados na Tabela 21. Landeiro et al., (2007) encontraram *Vibrio parahaemolyticus* em mariscada, pronta ao consumo, armazenada por sete dias em refrigeradores domésticos, e constataram ocorrência de contaminação cruzada no sistema de refrigeração,

Quando a presença de *V. parahaemolyticus* é quantificada, alguns autores citam a Legislação Federal que estabelece um padrão de  $10^3$  NMP/g (TORRES; FERNANDEZ, 1993; FERNANDEZ et al., 1988; HOFFMANN et al., 1999, apud Farias 2006).

Segundo Ripabelli et al., (2003), o *Vibrio alginolyticus*, também identificado neste trabalho, oferece perigo quando atinge concentração suficiente para causar doença durante os períodos quentes do ano no mar Adriático, na Itália.

Honda et al., (2000) apud Farias (2006) mostram que a contagem de *Vibrio* sp que causa a gastroenterite é de  $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^7$  UFC/g através de evidências experimentais, o que coincide com os dados de Huss (1997), que mostram que a dose mínima infectiva é da ordem de  $10^5$  a  $10^6$  células para o *Vibrio* spp patogênico.

Normanno et al., (2006) estudaram a presença de *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e micro-organismos de origem fecal

em mexilhões *in natura* da espécie *Mytilus galloprovincialis* cultivado na Itália e encontraram 10,6 % das amostras com *Vibrio* spp.; 7,83 % com *Vibrio parahaemolyticus*, 2,83 % com *Vibrio vulnificus*, 4,66 % para coliformes fecais acima do limite e 0,16 % com *Salmonella* spp. Os mesmos autores mostram a relação entre a presença de *Vibrios* e a contagem de coliformes, em que um poderia indicar a presença do outro.

Di Pinto et al. (2008) encontraram *Vibrio parahaemolyticus* em 5,2 % dos mexilhões e 6,2 % das áreas de crescimento de mexilhões, respectivamente.

Lhafi e Khüni (2007) estudaram a contaminação microbiana no mexilhão *in natura* da espécie *Mytilus edulis* e encontraram *Vibrio* spp. em 74,4 % das amostras analisadas, *Vibrio alginolyticus* em 51,2 % das amostras, seguida do *Vibrio parahaemolyticus* (39,5 %).

Baffone et al., (2000) detectaram a presença de *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus* em 18 % das amostras de mexilhões frescos, coletados do mar.

Os valores encontrados por esses estudos comprovam a incidência de *Vibrio* spp. em mexilhões *in natura* em diversos lugares no mundo apresentando variação conforme a temperatura e condições sanitárias da água de cultivo.

Laloo et al., (2000) estudaram as condições sanitárias de ostras comercializadas em Trinidad e Tobago e os resultados obtidos mostraram elevada carga microbiana das amostras, não sendo recomendada para consumo. Os autores sugerem a padronização das operações pós-coleta e a necessidade da indústria mostrar interesse com a sanidade dos produtos.

O *Codex Alimentarius* (Termo de Cooperação nº 37, 2006) destaca que a simples descoberta, por meio de uma análise de presença-ausência, de determinados micro-organismos conhecidos como causadores de doenças transmitidas por alimentos (como o *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*) não indica necessariamente uma ameaça à saúde pública, desde que sejam observadas as contagens e a incidência desse micro-organismo e/ou toxinas produzidas no alimento mais detalhadamente. A avaliação microbiológica do mexilhão processado no presente trabalho limita a sua comercialização na forma refrigerada devido à presença de *Vibrio alginolyticus* ao final do processo, porque há o risco do produto ser consumido sem previa cocção.

A vida útil do produto, baseados nos resultados microbiológicos, é inferior a sete dias, pois a partir deste período, a contagem microbiana atinge um valor que compromete as características sensoriais do

produto. Essa informação contraria a vida útil estimada pelo fabricante, equivalente a 20. O padrão para um consumo aceitável do mexilhão cozido e resfriado durante o armazenamento está condicionado ao apresentado na situação 4 (Tabela 22), desde que seja determinado o aumento da vida útil do produto. A Tabela 22 apresenta as diferentes respostas envolvendo o produto e avaliação de risco ou não, na forma em que será consumido.

**Tabela 22** - Considerações sobre as condições de comercialização e consumo do mexilhão processado na indústria.

SITUAÇÃO	PRODUTO	CONSUMO	JUSTIFICATIVA
1	Produto final pronto para o consumo sem tratamento térmico posterior	Perigo/risco (grande possibilidade de contaminação)	O produto não atende as condições microbiológicas devido a presença de <i>Vibrio</i> sp Necessidade de revisão das condições de processamento.
2	Consumo imediato do produto tratamento térmico	Com restrições – máximo em 5 dias	Contagem de psicrófilos e psicrotróficos dentro do aceitável para as características do produto; porém apresenta elevação no período de armazenamento. <i>Vibrio</i> sp é eliminado na cocção.
3	Consumo do produto armazenado com tratamento térmico	Arriscado	Problemas de deterioração decorrente da ação de micro-organismos psicrófilos e micro-organismos psicrotróficos Alteração das características sensoriais. Possível produção de compostos não favoráveis ao consumo humano.
4	Hipótese: Consumo do produto acondicionado em atmosfera modificada e condicionada sob refrigeração	Adequado	Condição: melhoria do processamento atual da empresa, que compreende: – Correções no envase; – Beneficiamento do mexilhão em temperatura adequada; – Condicionamento das embalagens à temperatura de refrigeração, sem variações de temperatura durante o transporte e comercialização;

## 6.5 ANÁLISES COMPLEMENTARES AO PROCESSAMENTO DE MEXILHÃO

Os valores médios de pH e da temperatura nos tanques de lavagem e resfriamento dos mexilhões estão apresentados na Tabela 23. O maior valor de pH foi encontrado na água do tanque de lavagem (7,2), seguido da água do tanque de resfriamento I (6,0) e da água do tanque

de resfriamento II (5,5). Esses resultados mostram que apenas a água do Tanque II está dentro do esperado e nas demais etapas a concentração do cloro residual não é suficiente para manter as condições de sanidade do produto. O ideal é que para águas cloradas o pH do meio seja entorno de 5,5 para reduzir a carga microbiana de alimento.

**Tabela 23** - Médias de pH e temperatura das águas envolvidas no processamento do mexilhão

ÁGUA NO PROCESSAMENTO	pH	TEMPERATURA (°C)
Água de lavagem	7,2 ± 0,2	21 ± 1
Água do tanque de resfriamento I (Após a cocção)	6,0 ± 0,1	7,9 ± 1
Água do tanque de resfriamento II (Após o desconchamento)	5,5 ± 0,15	8,8 ± 1

As temperaturas encontradas na água dos tanques de lavagem e de resfriamento foram diferentes nos pontos de análise. Para a água de lavagem das conchas, a temperatura média de 21 °C, Nesta etapa do processo, não é requerida uma faixa específica de temperatura pelo fato da lavagem ser realizada na concha fechada para a retirada de lodo e impurezas. Nos tanques de resfriamento I e II as temperaturas foram de 7,9 °C e 8,8 °C, respectivamente. Esses valores estão acima do requeridos como ideal para água de contato direto com alimento, que seria de 0 °C. O declínio e controle da temperatura da água de processamento após o processo de cocção seria o esperado para melhoria da qualidade do produto. Outro aspecto a ser considerado é o tempo de imersão do produto para resfriamento.

A taxa segura de resfriamento, levando-se em conta o tempo máximo permitido para atingir determinada temperatura, varia conforme o número de bactérias presentes antes do resfriamento. Outros fatores como a geometria do produto, tamanho, composição e método de resfriamento interferem no comportamento desse processo (WANG; SUN, 2002).

O resfriamento por água gelada é considerado um método rápido e eficiente, onde o calor dos alimentos é retirado com a água como meio de resfriamento, a baixas temperaturas (TERUEL et al., 2003). Porém, para a eficiência desse método, o controle da qualidade da água em relação ao pH, cloração e micro-organismos é fundamental.

### 6.5.1 Etapa de cozimento

Em função dos resultados das análises microbiológicas verificou-se a temperatura durante a cocção de mexilhões realizados na empresa. A Figura 17 mostra o gráfico obtido em que a temperatura do vapor de água (100 °C) é atingida em três pontos analisados no cesto da cocção. Termopar 1 mostra o comportamento da temperatura na parte superior do recipiente de cocção. Observa-se que o tempo requerido para atingir a temperatura de processo (100 °C) é de aproximadamente 200 segundos e permanece nessa temperatura durante 50 segundos. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que não há completa vedação na parte superior do recipiente, e com isso, o calor se dissipa mais facilmente, dificultando a manutenção da temperatura.

A parte interna do mexilhão (Termopar 2 – Figura 17), atinge 100 °C durante o processo, e permanece nesta temperatura durante 3,3 min. O Termopar 3 mostra a temperatura registrada no centro do cesto de cocção. Os resultados mostram o tempo necessário de cozimento não foi suficiente para destruir a flora microbiana termo resistente. Nesse sentido, recomenda-se que o processamento térmico seja revisado para garantir que carga microbiana termo resistentes sejam efetivamente reduzidos.

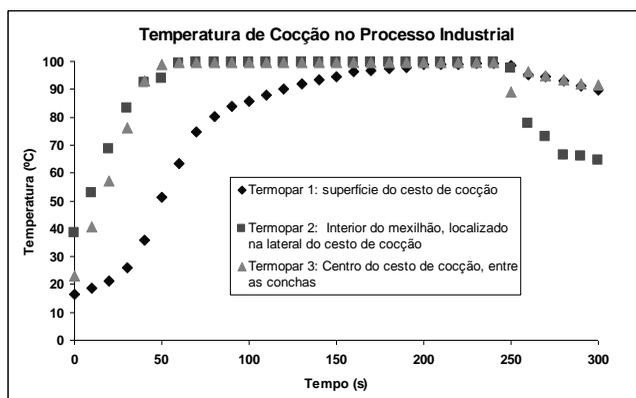


Figura 17 - Perfil da temperatura no cesto e nos mexilhões no decorrer do processo de cocção.

Nas condições atuais aplicadas na empresa avaliou-se a letalidade térmica e comparou-se com a letalidade térmica do *Clostridium botulinum*, o micro-organismo mais resistente do grupo observado, baseado nos dados da literatura.

O cálculo do somatório da letalidade térmica do processo de cocção industrial, considerando a temperatura de referência a 121 °C está apresentado na Tabela 24. Os dados escolhida para a realização dos cálculos de letalidade e do valor de esterilização do processo, foi os da curva obtida da parte superior do equipamento de cocção (Termopar 1), devido esta apresentar o pior desempenho em termos de tempo e temperatura adequada para o tratamento, de forma que seja expressa a realidade do processo.

De acordo com o obtido nos cálculos (Tabela 24) o somatório da letalidade, partindo de  $(F = \sum L.dt)$ , que resulta no valor F de esterilização, encontrada para o processo foi de  $F = 0,24$  min. a temperatura de 121 °C.

O valor F para o *Clostridium botulinum*, para alimentos de baixa acidez (pH > 4,5), como o mexilhão, 12 reduções decimais são requeridas, conforme estabelecido pelas agências cujo  $Z = 10$  °C (FDA, 2007). Isso significa que a redução de 12 D de esporos de *Clostridium botulinum* é a redução para um esporo viável a cada 1 bilhão ( $10^{12}$ ) de embalagens processadas. Quando se utiliza a temperatura de referência de  $T_{ref} = 121$  °C e  $Z_{ref} = 10$  °C, F é denominado de  $F_0$  e, neste caso,  $D_{Tref} = 0,21$  min “(STUMBO, 1973; ORDÓÑEZ et al., 2005 apud BERTO; VITALI, 2008).

Baseado na literatura realizou-se o cálculo de  $F_{121\text{ °C}}$ , com o  $D_{Tref} = 0,21$  min e 12 reduções decimais. O valor mínimo encontrado para se obter 12 reduções decimais foi de 2,52 minutos.

O numero de redução decimais obtido a partir da divisão de  $F_0$  calculado para o processo (0,24 min) por  $D_{Tref} = 0,21$  min, resultou em 1,1 reduções decimais para o processo de cocção da empresa. Esse resultado mostra que o numero de redução é insuficiente, visto que o desejável seriam as 12 reduções decimais.

Em se tratando de um processo que realiza cocção e não visa a esterilização do produto, algumas considerações devem ser feitas. A probabilidade de haver crescimento de *Clostridium botulinum* pode ser controlada, pois embora o processamento não seja suficiente para eliminar os esporos de *C. botulinum*, os demais micro-organismos, menos resistentes, são eliminados. Portanto, havendo um controle rigoroso de temperatura nas etapas seguintes do processamento, bem como a conservação do produto em temperaturas abaixo da faixa de crescimento desse micro-organismo (temperaturas de 7 °C) é eficaz no controle microbiano do produto, minimizando o seu risco.

**Tabela 24** - Cálculo do valor de letalidade para o tratamento térmico realizado no processamento.

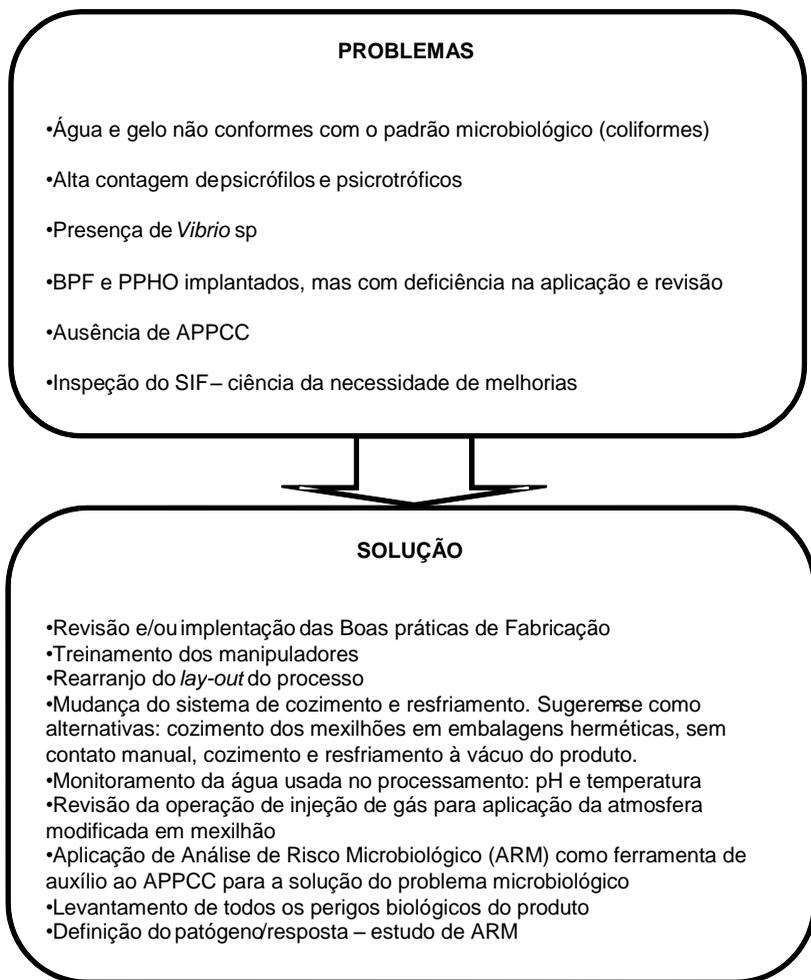
t (s)	t(min)	T (s)	121 - T	$10^{-\left(\frac{121-T}{10}\right)}$	$L = t \cdot 10^{-\left(\frac{121-T}{10}\right)}$
0	0,00	16,54	104,47	3,577E-11	0,000E+00
10	0,17	18,80	102,20	6,026E-11	1,004E-11
20	0,33	21,26	99,74	1,061E-10	3,537E-11
30	0,50	26,02	94,98	3,175E-10	1,588E-10
40	0,67	36,06	84,94	3,204E-09	2,136E-09
50	0,83	51,39	69,62	1,093E-07	9,106E-08
60	1,00	63,29	57,71	1,694E-06	1,694E-06
70	1,17	74,75	46,25	2,370E-05	2,765E-05
80	1,33	80,21	40,79	8,343E-05	1,112E-04
90	1,50	83,77	37,23	1,891E-04	2,837E-04
100	1,67	85,88	35,12	3,075E-04	5,124E-04
110	1,83	87,99	33,01	4,999E-04	9,165E-04
120	2,00	90,13	30,87	8,192E-04	1,638E-03
130	2,17	92,01	28,99	1,263E-03	2,736E-03
140	2,33	93,40	27,60	1,738E-03	4,055E-03
150	2,50	94,46	26,54	2,218E-03	5,545E-03
160	2,67	96,20	24,80	3,313E-03	8,834E-03
170	2,83	96,85	24,15	3,844E-03	1,089E-02
180	3,00	97,34	23,66	4,301E-03	1,290E-02
190	3,17	97,83	23,18	4,814E-03	1,524E-02
200	3,33	98,79	22,21	6,013E-03	2,004E-02
210	3,50	98,98	22,03	6,273E-03	2,196E-02
220	3,67	98,93	22,08	6,202E-03	2,274E-02
230	3,83	99,10	21,90	6,454E-03	2,474E-02
240	4,00	99,26	21,74	6,693E-03	2,677E-02
250	4,17	98,52	22,48	5,647E-03	2,353E-02
260	4,33	95,09	25,92	2,562E-03	1,110E-02
270	4,50	94,35	26,66	2,160E-03	9,721E-03
280	4,67	92,88	28,12	1,543E-03	7,201E-03
290	4,83	91,07	29,93	1,017E-03	4,916E-03
300	5,00	89,92	31,08	7,797E-04	3,898E-03
<b>L processo a 121 °C</b>					<b>0,24</b>

Em relação ao restante da microbiota presente no mexilhão, outro micro-organismo cuja presença foi desfavorável ao processamento, *Vibrio sp.*, é considerado relativamente sensível ao tratamento térmico (LIEW et al., 1998) e foi eliminado na cocção a 100 °C. Os mesmos autores colocam que após 30 s de tratamento térmico com água a 99 °C em berbigão da espécie *Anadara granosa* a contagem inicial de *Vibrio sp.* inoculada foi reduzida para < 1 log UFC/g. Outros fatores que

influenciam a penetração do calor durante o tratamento térmico de frutos do mar são a variedade de tamanho e formato. Desta forma, baseados nos dados de cocção apresentados pela empresa e o tempo de destruição térmica do *Vibrio* sp mediante altas temperaturas, o processo observado neste trabalho é suficiente para a eliminação do *Vibrio* sp. O surgimento deste em outras etapas provavelmente esta relacionado à recontaminação da matéria-prima por manipulação e higiene inadequada dos equipamentos e utensílios envolvidos no beneficiamento.

## 7 SUGESTÕES PARA MODIFICAÇÕES NA LINHA DE PROCESSAMENTO DO MEXILHÃO

Com base nos resultados das análises microbiológicas, são sugeridas alterações para o processamento dos mexilhões utilizados no presente trabalho (Figura 18).



**Figura 18** - Fluxograma de ação para a solução dos problemas na indústria processadora de mexilhões

## 7.1 ANÁLISE DO PROCESSO

Após a avaliação do problema, fluxograma do processo mostrado pela Figura 15 foi utilizado para analisar todas as etapas do beneficiamento dos mexilhões. A seguir, são apresentadas sugestões para melhoria nas etapas de processo onde foram detectadas deficiências.

### 7.1.3 Sugestões para cada etapa do processamento dos mexilhões

#### 7.1.3.1 Recepção: Lavagem e pré-seleção dos mexilhões

A lavagem dos mexilhões deve ser realizada preferencialmente imediatamente após a coleta, garantindo que o produto esteja o mais fresco possível.

**A) *Procedência*** - Importância da água de cultivo: os mexilhões são cultivados em água de estuários e costas marinhas, ambiente propício à contaminação fecal. Outro perigo potencialmente grave é o envenenamento paralisante por moluscos, em virtude de multiplicação de espécies de dinoflagelados marinhos que sintetizam uma toxina que não é desnaturada pela cocção ou eliminada pela depuração dos moluscos (ICMSF, 1997).

Sugere-se que a indústria controle a procedência da matéria-prima por meio de mapeamento das áreas de cultivo, verificando a legalidade e a qualidade das águas de cultivo, de forma a assegurar as condições do produto, conforme exige a legislação - CONAMA 357 /2005. Outras medidas importantes são:

- a) Apenas os moluscos provenientes de captura em água não contaminada devem ser considerados seguros.
- b) mexilhões mortos devem ser descartados.
- c) proibição da coleta de moluscos nas áreas onde ocorre o envenenamento paralisante nos períodos de multiplicação de dinoflagelados, quando a presença dessa toxina atinge níveis perigosos (ICMSF, 1997).
- d) higiene adequada no local de processamento dos moluscos também pode reduzir os perigos (HUSS, 1997).

**B) *Pré-seleção***: sugere-se a seleção previa dos mexilhões como pré-requisito para eliminação dos indivíduos mortos ou que apresentarem alterações, como valvas soltas quebradas e com presença

de incrustantes. A pré-seleção deve ser feita após a lavagem e debulhe dos mexilhões, antes destes entrarem para o beneficiamento. Os mexilhões devem passar por uma inspeção visual (percepção de alterações físicas), onde cada manipulador deve vestir-se com roupa apropriada, com o uso de toucas e luvas, salientando a necessidade de que estas devem estar limpas e trocadas a cada interrupção. Os mexilhões que apresentarem injúrias devem ser descartados. Recomenda-se também nessa etapa a seleção por tamanho comercial (de 7 a 8 cm), típicos dos animais que possuem gônadas totalmente preenchidas. Para tal, deve ser reservada uma mesa de seleção, onde possa ser afixada nesta uma escala de medida. Os bivalves devem estar ainda vivos, com as valvas fechadas, com retenção de grande quantidade de água incolor e límpida nas conchas. A carne deve estar aderente às conchas e de coloração amarelada nos mexilhões (FARIAS, 2006 apud Bertullo, 1975; BRASIL, 1997). Os mexilhões pré-selecionados serão acondicionados em caixas e seguem então para a linha de processamento.

**C) Sistema de depuração:** adoção de um sistema de depuração é uma forma de eliminar outras impurezas e parte da microbiota proveniente das águas de cultivo do mexilhão a ser comercializado na forma *in natura*. O objetivo da depuração é a eliminação de micro-organismos do trato intestinal dos mexilhões e de compostos orgânicos que possam conter toxinas até proporções não prejudiciais à saúde. O sistema consiste na imersão dos mexilhões vivos, após a limpeza das conchas, em um tanque com água clorada e limpa, por determinado período até os moluscos atingirem níveis aceitáveis de contagem de coliformes. Suplicy (1998) desenvolveu um sistema de depuração para mexilhões em um período de 48 horas. As desvantagens da instalação de uma depuradora é o alto custo de implantação e também de manutenção do sistema. A duração do tratamento também é um fator influente, pois 48 h de tratamento antes de entrar no processo pode não ser viável para a empresa. A grande vantagem do sistema de depuração é a redução da carga microbiana, cujo contato com água limpa durante o período de 48 h reduz em até 95% da microbiota inicial (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

### **7.1.3.2 Cocção do mexilhão e condições do produto**

A eliminação ou redução da população microbiana com o

tratamento térmico depende da resistência dos micro-organismos presentes nos alimentos. A utilização de um tempo eficiente do tratamento térmico requer o estudo da microbiota que se deseja eliminar e o grau de resistência térmica. Segundo Estelles (2003), o calor propicia a desnaturação das proteínas e perda de nutrientes, por isso o tempo e temperatura adotados devem levar esses fatores em conta, de modo a minimizar as alterações indesejáveis.

No caso do mexilhão resfriado, a eliminação de micro-organismos deteriorantes também se faz necessária. Por isso, sugere-se a verificação do tempo e temperatura utilizados na cocção e se são suficientes para eliminar os micro-organismos que oferecem perigo ao produto. Sombrio (2005) cita que a escolha dessas variáveis envolve também a preservação das características físico-químicas e sensoriais.

A temperatura da sala de desconchamento, bem como de todos os setores que envolvem o beneficiamento do mexilhão deve ser mantida a 10 °C ou menos, conforme sugere Estelles (2003) para salas de corte e evisceração de carnes, para prevenir proliferação microbiana. Librelato e Shikida (2010) relatam que durante todo o fluxo de processamento de pescado a temperatura do produto e da sala de processo devem ser mantidas em temperatura de refrigeração.

Assim, sugere-se que a coleta e o cozimento dos mexilhões ocorra na sequência, ou seja, que logo após a lavagem, este seja encaminhado diretamente para a cocção, sem passar por armazenamento do produto *in natura*, para evitar multiplicação dos micro-organismos psicotróficos bem como a produção de enzimas por estes, que interferem na degradação.

### **7.1.3.3 Sistema de resfriamento após a cocção**

O sistema de resfriamento do produto após a cocção deve ocorrer por choque térmico, e o método de imersão pode ser mantido, desde que sejam adotadas algumas adaptações:

- a) o tanque de recepção dos mexilhões deve ser de aço inoxidável;
- b) evitar o contato dos mexilhões com a água resfriada e gelo. Neste caso, o resfriamento poderia ser sob vácuo ou ainda em câmaras com controle de temperatura. O controle da câmara deve ser realizado com termopares, e a temperatura deve estar entre 0 e 1°C.

A utilização de vácuo para a realização do resfriamento pode ser aplicado para atingir a temperatura ideal para o desconchamento do mexilhão. Huber et al., (2003) relata que os mexilhões devem apresentar temperatura inferior a 40 °C para serem desconchados. A vantagem da técnica é a rapidez com que o resfriamento ocorre, e seu princípio básico é a remoção do calor através da evaporação da água livre do produto. O resfriamento de hortaliças folhosas como a alface é realizado com a aplicação de vácuo.

Enquanto for mantido o sistema original de tanques com água e gelo, recomenda-se o registro da temperatura através da marcação periódica em planilhas. A troca da água de contato com os mexilhões deve ser realizada em curtos intervalos de tempo, de preferência a cada meia hora. Segundo Rodrigues (2008), o tempo adequado para a imersão é de 60 segundos, pois evita alterações indesejáveis na textura e garante a inativação enzimática. Este tipo de prática, porém, oferece o risco de contaminação microbiológica através da água de resfriamento além de elevar o consumo de água no processamento (HUBER et al., 2003).

Em um dos sistemas testados por Huber et al. (2003) utiliza uma câmara de resfriamento a vácuo (*marca Ilka, modelo TBV 1000 - V, Alemanha*), com volume interno de aproximadamente 1000 litros, sendo revestida externamente com isolamento de lã de vidro de 100 mm de espessura. Seu fechamento é realizado por meio de uma porta com borrachas de vedação, munida de travas mecânicas. Uma bomba de vácuo, com vazão nominal de 333 L/min e medidores de temperatura e de pressão internas equipam o sistema. Para o teste nesse sistema o peso médio das amostras de mexilhões tiveram 7,50 kg e foram acondicionadas no próprio recipiente utilizado para o cozimento (panela de 50 litros). A Figura 19 apresenta a câmara de vácuo e o recipiente com mexilhões utilizados para a técnica de resfriamento a vácuo.

Um sistema que combine o cozimento e o resfriamento a vácuo para os mexilhões vem sendo estudado pelo Laboratório de Propriedades Físicas – PROFI da Universidade Federal de Santa Catarina e é um sistema de interesse da indústria local. O desenvolvimento de um sistema desse porte reduz ainda mais a manipulação do produto.



**Figura 19** - Câmara de vácuo e o recipiente com mexilhões para a técnica de resfriamento a vácuo  
Fonte: HUBER et al., (2003)

#### 7.1.3.4 Desconchamento dos mexilhões

Nesta etapa, é importante adotar as BPF's para que haja conscientização dos manipuladores quanto aos seguintes itens:

- a) uso do jaleco de mangas compridas;
- b) manutenção da temperatura do ambiente de desconchamento igual ou abaixo de 10 °C, para evitar as reações de degradação e proliferação microbiana.
- c) minimizar o tempo de espera dos produtos desconchados.
- d) recomenda-se que durante o desconchamento, seja realizada uma lavagem na parte interna dos mexilhões em água hipoclorada resfriada (5 ppm), seguida da drenagem.

#### 7.1.3.5 Pesagem e seleção do mexilhão para o envase

Recomendações:

- a) pesagem contínua enquanto o mexilhão estiver na linha de produção, mantendo-se um fluxo de forma a evitar o acúmulo de produto na mesa de seleção.
- b) rotatividade de funcionários no setor, mesmo durante as paradas no expediente.
- c) esterilizar os utensílios e tomar as medidas de higiene com as mãos. O uso de luvas não evita a contaminação, por isso, devem ser trocadas ao sair da área de manipulação.

### 7.1.3.6 Envase do produto em atmosfera modificada

Recomendações:

- a) a seladora do tipo bandeja deve ter o seu sistema de selagem revisto. As análises de cromatografia (Figura 16) mostram que há ausência na proporção total de gás dentro da embalagem uma hora após o processo.

Recomendam-se medidas de controle da injeção de gases na seladora tanto para as bandejas quanto para as embalagens flexíveis, pois ocorre variação de quantidade de gás durante o acondicionamento.

- b) O resfriamento sob água e gelo provavelmente provocam exudação da água durante o armazenamento. Nessa etapa observa-se que esse procedimento prejudica o produto. A barreira da embalagem ao CO<sub>2</sub> pode ser associada à permeabilidade aos vapores de água.
- c) Estudo da permeabilidade ao CO<sub>2</sub> e ao vapor de água da embalagem.

Com a realização desse estudo, torna-se possível verificar se a embalagem usada é adequada à aplicação de atmosfera modificada e a evitar a perda de CO<sub>2</sub> da embalagem para o ambiente, tendo em vista que a vida útil de um produto é dependente do crescimento da microbiota contaminante, cuja inibição pode ocorrer por técnicas de embalagem (emprego de atmosfera modificada e/ou vácuo) e estocagem a frio.



## 8 CONCLUSÃO

As características físico-químicas do mexilhão *Perna perna* não apresentaram diferença significativa em relação às atmosferas testadas. Este comportamento ocorreu provavelmente devido a deficiência da injeção de gás nas embalagens. A água e o gelo envolvidos no processamento apresentam não conformidade com a Legislação vigente em relação à presença de coliformes, e oferece risco de recontaminação no produto devido à presença de *Vibrio* sp. nos tanques de lavagem e de resfriamento.

A análise microbiológica dos mexilhões mostrou que há problemas quanto a ocorrência de micro-organismos psicrófilos e psicrotróficos com valor próximo ao limite para o início da degradação do produto durante o armazenamento e a presença de *Vibrio* sp., com reincorporação deste antes do envase. O produto atende aos requisitos da Legislação vigente quanto as contagens de coliformes a 35 °C, estafilococos coagulase positivo e *Salmonella* spp. Os clostrídios sulfito-redutores apresentaram maior contagem nas amostras de mexilhão *in natura*, e para os mexilhões cozidos houve redução.

A análise do tratamento térmico mostrou que o processo não é suficiente para eliminar os esporos de *Clostridium botulinum*, porém é eficiente para eliminar o restante da microbiota envolvida. O risco de contaminação por *C. botulinum* é eliminado com a conservação da temperatura do produto durante o processamento e armazenamento em temperaturas abaixo da faixa de refrigeração (7 °C).

De acordo com os resultados sugere-se que a empresa revise as Boas Práticas de Manipulação no processamento de seus produtos, particularmente, do mexilhão, produto avaliado no presente estudo.

O produto não apresenta vida útil compatível com o indicado na embalagem. O processamento necessita de uma revisão e implementação das BPF, para que possa ser viabilizado um novo estudo quanto à vida útil do produto. Apenas após a implementação dessas melhorias será possível o estudo com atmosfera modificada em diferentes proporções de gases em mexilhões pré-cozidos e resfriados.

A Legislação Brasileira sobre o assunto ainda é deficiente e não contempla diversos aspectos e etapas do processo produtivo e necessita, portanto, ser atualizada para se equiparar aos marcos legais dos demais países produtores de moluscos bivalves.



## REFERÊNCIAS

ANDRADE, I.; ROLIM, M. B. Q.; LAPENDA, A. M. V. S.; MOURA, A. P. B. L. Qualidade microbiológica em moluscos bivalves comestíveis "ostras" comercializadas na praia de Boa Viagem, Recife - PE. In: JEPEX, 2009.

ANTONIOLLI, M. A. **Vida Útil do Mexilhão *Perna perna* (L.) Processado e Mantido Sob Refrigeração.** Florianópolis, 1999. 98 p. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 16 th Edition, 4 th Revision, Gaithersburg, 1998.

A.P.H.A. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20 ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Baltimore: Maryland, 2001.

ARCHER, R. M.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p. 379-386, jul/set, 1994.

BAFFONE, W.; PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; BARBIERI, E.; CITTERIO, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 9-18, 2000.

BANDEIRA, M. T. P. S. **Qualidade Microbiológica da Carne Bovina.** Monografia – especialização. Curso de Especialização em Qualidade de Alimentos. Brasília – DF, 2004. 43 p. Universidade de Brasília, UNB.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos.** Forvisão: Guimarães, Portugal, 2003. 109 p.

BERTO, M. I.; VITALI, A. A. Controle em tempo real em um processo de esterilização convencional. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 4, p. 252-262, out./dez. 2008.

BRASIL. Portaria 36, de 19 de janeiro de 1990. Dispõe sobre a água para o consumo humano. Brasília, DF: Governo Federal, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1428, de 26 de novembro de 1993. Dispõe sobre o controle de qualidade na área de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 18415-9, 2 dez. 1993. Seção I.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária (Dispoa). **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003.

BRASIL, **Resolução CONAMA n°357**, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.

BRASIL. ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária. **Portaria SVS/MS n° 326**, de 30 de julho de 1997: Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtor/industrializadores de alimentos. 1997.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RDC n° 54**, de 19 de junho de 2000. Regulamento Técnico para Fixação da Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural. Brasília: ANVISA, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa N° 20**, de 31 de Julho de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução – RDC n°12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos em Alimentos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)> Acesso em: 22 fev. 2010.

BRASIL. ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC**

nº 275, de 21 de outubro de 2002: Regulamento Técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. 2002.

BRASIL. ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de setembro de 2004.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Portaria nº 1.469/2000**, de 29 de dezembro de 2000: Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 32 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 518** de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial. Brasília. 26 de março de 2004, p. 266-270.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria Nº 1, de 07 de outubro de 1981. Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos. Anexo XI – Pescado Fresco e Congelado. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=13348>> Acesso em: 18 mar. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal RIISPOA. Brasília, DF, 1980. 165 p. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>> Acesso em: 12 fev. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento Técnico - Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <[http://www.pqsys.com.br/links/p\\_451\\_1.htm](http://www.pqsys.com.br/links/p_451_1.htm)> Acesso em: 24 fev. 2010.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, 2004.

CAGLAK, E; CAKLI, S.; KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1293-1299, 2008.

CAL, J. I. Problemas Ecológicos del Cultivo y Comercialización del Mejillón. Disponível em: < [webs.uvigo.es/xsimon/...07/Traballo%20%2017.doc](http://webs.uvigo.es/xsimon/...07/Traballo%20%2017.doc) > Acesso em: 24 ago 2009.

CAMPOS, C. J. A.; CACHOLA, R. A. Faecal coliforms in bivalve harvesting areas of the Alvor Lagoon (Southern Portugal): Influence of seasonal variability and urban development. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 133, p. 31-41, 2007.

CAVALLO, R. A.; STABILI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Research**, v. 36, p. 3719 – 3726, 2002.

CELOFIX. Produtos Vacuofix. Disponível em: <<http://www.celofix.com.br/produtos/default.asp?tp=1;nrseq=34>> Acesso em: 06 fev. 2010.

**CODEX ALIMENTARIUS. Code of practice for fish and fishery products.** World health organization food and agriculture organization of the united nations, Roma, 2009.

**CODEX ALIMENTARIUS.** Organização Pan-Americana da Saúde. **Higiene dos Alimentos – Textos Básicos** / Organização Pan-Americana da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006.

**CODEX ALIMENTARIUS. Standard for live and raw bivalve molluscs.** Codex Standard 292, 2008.

CORDEIRO, D. **Qualidade do Mexilhão *Perna perna* submetido ao**

**processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento.** Piracicaba, 2005. 82 p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo – USP.

CORDEIRO, D.; LOPES, T. G. G.; OETTERER, M.; PORTO, E. GALVÃO, J. A. Qualidade do Mexilhão *Perna perna* Submetido ao Processo Combinado de Cocção, Congelamento e Armazenamento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n.1, p. 165-179, jan.-jun. 2007.

CORRÊA, A. A.; ALBARNAZ, J. D.; MORESCO, V.; POLI, C. R.; TEIXEIRA, A. L.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, R. M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium*. **Marine Environmental Research**, v. 63, p. 479-489, 2007.

CUNHA, D. F.; TAVARES, T.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Condições higiênico-sanitárias e incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em alface (*Lactuca sativa*) servida em restaurantes self-service. **Revista de Biociências**, Taubaté, v.11, n. 3-4, p. 155-159, jul/set, 2005.

CUNHA, M. A.; SILVA, M. R. Métodos de Detecção de Microrganismos Indicadores. **Saúde: Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1, n.1, p.09-13, jan-jun 2006.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 22, n.3, p. 263 – 271, set.- dez, 2002.

DA SILVA, M. E. Z. S.; SANTANA, R. G.; GUILHERMETTI, M.; FILHO, I. C.; ENDO, E. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURAC, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. **International Journal of Hygiene, Environment and Health**, v. 211, p. 504-509, 2008.

DAVID, J. R. D.; GRAVES, R. H.; CARLSON, V. R. **Aseptic processing and packaging of food – A food industry perspective.** Boca Raton: CRC Press LLC, 1996.

DE BUYSER, M.L.; AUDINET, N.; DELBART, M. O.; MAIRE, M.; FRANÇOISE, F. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive *staphylococci* in cheeses made from raw milk. **Food Microbiology**, v.15, p. 339–346, 1995.

DESMARCHELIER, P. M.; HIGGS, G. M.; MILLS, L.; SULLIVAN, A. M.; VANDERLINDE, P. B. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 221-229, 1999.

DE SOUZA, R.V.; NOVAES, A. L. T.; DOS SANTOS, A. A.; RUPP, G. S.; SILVA, F. M. Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves no Litoral de Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, p. 54-59, 2009.

DI PINTO, A.; CICCARESE, G.; DE CORATO, R.; NOVELLO, L.; TERIO, V. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. **Food Control**, v.19, p. 1037-1041, 2008.

EEC. **Council Directive No. 91/492/EEC**: Laying down the health conditions for production and the placing on the market of live bivalve molluscs. **Official Journal of the European Communities** No. L 268/1. 1991.

EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. Mexilhões, Ostras e Vieiras. Disponível em: < **[http://www.epagri.rct-sc.br/index.php?option=com\\_content;view=article;id=208:mexilhoes-ostras-e-vieiras;catid=29:maricultura;Itemid=48](http://www.epagri.rct-sc.br/index.php?option=com_content;view=article;id=208:mexilhoes-ostras-e-vieiras;catid=29:maricultura;Itemid=48)** > Acesso em: 26 mar 2009.

ERKAN, N. Changes in quality characteristics during cold storage of shucked mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and selected chemical decomposition indicators. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2625–2630, 2005.

ESTELLES, R. S. **Importância do Controle da Temperatura e do Tratamento Térmico na Preservação dos Nutrientes e da Qualidade dos Alimentos**. Brasília, DF, 2003. 32 p. Monografia de Especialização em Qualidade de Alimentos. Universidade de Brasília.

FALCÃO, J. P.; DIAS, A. M. G.; CORREA, E. F.; FALCÃO, D. P. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. **Food Microbiology**, v. 19, p. 269-276, 2002.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations fondation internationale carrefour. **Good practices for the meat industry**. Rome, 2004. 312 p.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture, 2008. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>> Acesso em: 13 jul. 2009.

FARIAS, M. C. A. **Avaliação das Condições Higiénico – Sanitárias do Pescado Beneficiado em Indústrias Paraenses e Aspectos Relativos à Exposição para Consumo em Belém – Pará**. Belém – PA, 2004. 67 p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v.2, p.1651–1660, 2000.

FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas**. Zaragoza: Acribia, 1994. 549 p.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Mexilhões: Biologia e Cultivo**. Apostila UFSC. 1997.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre :Artmed, 2002. 424 p.

FRANÇA FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 315-325, jul./set. 2006.

FRANCO, B. D. G. M. ; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo :Editora Atheneu, 2005. 196 p.

FREITAS, E. I.; SANTOS, M. C. S. ; FARAGE, S. TÓRTORA, J. C. O.

Avaliação da Qualidade Microbiológica de Mexilhões Comercializados na Área Urbana de Niterói – RJ. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 144, p. 101-105., 2006.

FUENTES, A.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; SERRA, J. A. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. **Food Chemistry**, v. 112, p. 295-302, 2009.

FURLAN, É. F ; GALVÃO, J. A. ; SALÁN, E. O. ; YOKOYAMA, V. A. ; OETTERER, M. Estabilidade físico-química e mercado do mexilhão (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba – SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 516-523, jul.-set., 2007.

GALVÃO, J. A. **Qualidade Microbiológica da Água de Cultivo e do Mexilhão *Perna perna* (Linneus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. Piracicaba, 2004. 128 p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, USP.

GALVÃO, J. A. ; FURLAN, É. F. ; SALÁN, E. O. ; PORTO, E. ; OETTERER, M. Características Físico-químicas e Microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da Água e dos Mexilhões Cultivados na Região de Ubatuba, SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.6, p. 1124-1129, nov./dez., 2006.

GIAMPIETRO, A.; REZENDE-LAGO, N. C. M. Qualidade do gelo utilizado na conservação de pescado fresco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p.505-508, jul./set., 2009.

GOULAS, A. E.; CHOULIARA, I.; NESSI, E.; KONTOMINAS, M. G.; SAWAIDIS, I. N. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal of Applied Microbiology**, n. 98, p. 752-760, 2005.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Microbiology**, v. 33, p. 121-127, 1996.

GRUPO DE ESTUDOS PESQUEIROS, UNIVALI. Disponível em:

<<http://siaiacad04.univali.br/404.html>> Acesso em: 24 ago. 2009.

HOLLEY, R. A.; GILL, C. O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carne se produtos cárneos. 2005. Disponível em: <[http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro\\_congresso/5.doc](http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro_congresso/5.doc)> Acesso em: 15 nov. 2009.

HUBER, E. **Resfriamento a vácuo de cortes de carnes após o cozimento**. Florianópolis, 2004. 85 p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

HUBER, E.; SOARES L.P.; LAURINDO J.B. Vacuum cooling of pre-cooked mussels for small scale. **Alimentos e Nutrição de Araraquara**, v.14, n.2, p. 165-170, 2003.

HUIS IN'T VELD, J. H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1-18, 1996.

HUNGERFORD, J. M. Fish and other marine products. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Washington, 1995. cap. 35, p. 1-30.

HUSS. H. H. Garantia da Qualidade para os Produtos de Pesca. **FAO Documento Técnico sobre as Pescas**. n. 334. Roma, FAO. 1997. 176p.

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*, v. 8, n. 2, p. 91-98, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo, 2009.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microrganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984, 431 p.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Microbiological Societies. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. 377 p. São

Paulo: Livraria Varela, 1997.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN DER STEEN, C.; DEBEVERE, J. Effect of high oxygen packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p. 197-210, 2001.

JAKSIC, S.; UHITIL S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L. G. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v. 13, p. 491-493, 2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Edição. Ed. Artmed, 2005.

KAI, M.; RUIVO, U. **Trabalhos apresentados no Seminário sobre Controle de Qualidade na Indústria do Pescado**. 1988. São Paulo: Loyola, 1988. 303p.

KIRBY, R. M.; BARTRAM, J.; CARR, R. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. **Food Control**, v.14, p. 283-299, 2003.

KONICA MINOLTA SENSING. INC. **Precise Color Communication Color Control from Perception to Instrumentation**.1998. 59 p.

LALOO, S.; RAMPERSAD, F.S.; LA BORDE, A.; MAHARAJ, K. L.; SOOKHAI, TEELUCKSINGH, J.D.; REID, S.; MCDOUGALL, L.; ADESIYUN, A.A. Bacteriological quality of raw oysters in Trinidad and the attitudes, knowledge and perceptions of the public about its consumption. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 99-107, 2000.

LANDEIRO, C. M. P. A.; ALMEIDA, R. C. C.; NASCIMENTO, A. T. M.; FERREIRA, J. S.; YANO, T.; ALMEIDA, P. F. Hazards and critical control points in Brazilian seafood dish preparation. **Food Control**, v.18, p. 513-520, 2007.

LEBERT, I.; BEGOT, C. LEBERT, A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8 – 7.0), water activity (0.97 – 1.00) and temperature (7 – 25°C). **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 53 -60, 1998.

LEE, J.; JUNG, D.; EOM, S.; OH, S.; KIM, Y.; KWAK, H. KIM, Y. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, p. 990 – 994, 2008.

LHAFI, S. K.; KÜHNE, M. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 297-300, 2007.

LIBRELATO, F. R.; SHIKIDA, S. A. R. L. Segurança Alimentar: Um Estudo Multidisciplinar da Qualidade do Filé de Tilápia Comercializado no Município de Toledo-PR. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/gepec/article/download/309/225>> Acesso em: 07 fev. 2010. 14:32

LIEW, W.S.; LEISNER, J.J.; RUSUL, G.; RADU, S.; RASSIP, A. Survival of *Vibrio* spp. including inoculated *Vibrio cholerae* 0139 during heat-treatment of cockles (*Anadara granosa*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 167-173, 1998.

LOUDA, J.W.; NETO, R. R.; MAGALHÃES, A. R. M.; SCHNEIDER, V. F. Pigment alterations in the brown mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. v.150, p. 385-394, 2008.

LUDORFF, W; MEYER, V. **El Pescado Y Los Productos de La Pesca**. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia, 1973, 342 p.

MAEDA, F. Y. **Cultivo de mexilhões *Perna perna* (L.) da empresa Cavalo Marinho na Praia do Cedro, Palhoça – SC**. Trabalho de Conclusão de Curso. 30 p. Curso de Graduação em Engenharia de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis / SC. 2008.

MAFART, P.; LEGUÉRINEL, I.; COUVERT, O.; COROLLER, L. Quantification of spore resistance for assessment and quantification of heating processes: A never-ending story. **Food Microbiology**, v. 27, p. 568 – 572, 2010.

MARQUES, H. L.A. **Criação Comercial de Mexilhões**. São Paulo:

Nobel, 1998, 109 p.

MARTINEZ-URTAZA, J.; LIEBANA, E. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the genetic diversity and clonal persistence of *Salmonella senftenberg* in mussel processing facilities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 153– 163, 2005.

MCLAUGHLIN, C. P.; MAGEE, T. R. A. The Determination of Sorption Isotherm and the Isothermic Heats of Sorption for Potatoes. **Journal of Food Engineering**, n. 35, p. 261-280, 1998.

MENDES, A. L. S. **Qualidade Microbiológica do Gelo para Consumo em Bebidas - Um Estudo nos Estabelecimentos das Zonas Balneares do Porto**. Porto, Portugal, 2009. 123 p. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto.

MIYAGUSKU, L.; CHEN, F.; LEITÃO, M. F. de F.; BAFFA, O. Avaliação microbiológica e sensorial da vida-útil de cortes de peito de frango irradiados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, , Supl 23, p. 7-16, dez, 2003.

NEILL, M. Microbiological Indices for total coliform and *E. coli* bacteria in estuarine waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 752–760, 2004.

NOBLE, W.C. ; NAIDOO, J. **Os Micro-organismos e o Homem**. 82 p. São Paulo: EPU : Ed. da Universidade de São Paulo, 1981.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v. 21, p. 343–361, 2010.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.98,

p. 73-79, 2005.

NOVAK, J. S. ; SAPERS, G. M. ; JUNEJA, V. K. **Microbial Safety of Minimally Processed Foods**. 360p. Washington DC: CRC Press, 2003.

ORDOÑEZ, J. A. P.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos – Volume I: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PASTORIZA, L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA, J. J. R. Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussel stored refrigerated. **European Food Research Technology**, v. 218, p. 415-419, 2004.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S, M, F. Composição Centesimal e de Minerais de Mariscos Crus e Cozidos da Cidade de Natal/RN. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n.21, v.2, p. 154-157, maio- ago, 2001.

PEREIRA, M. M. D.; FERREIRA, V. M.; VALADÃO, R. C.; OLIVEIRA, G. M.; ALENCAR, T. A.; RIBEIRO, A. L. M. S.; SILVA, P. P. O.; BARBOSA, C. G. Utilização da análise de coliformes como indicativo de sanidade dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guaíba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n.2, p.95-99, maio/ago, 2009.

PÉREZ, A. C. A. AVDALOV, N.; NEIVA, C. R. P.; NETO, M. J. L.; LOPES, R. G.; TOMITA, R. Y.; FURLAN, E. F.; MACHADO, T. M. Procedimentos Higiênico-Sanitários para a Indústria e Inspectores de Pescado: Recomendações. Projeto. Santos, 2007. 51 p.

PONCE, E.; KHANA, A. A.; CHENG, C.; SUMMAGE-WEST, C.; CERNIGLIA, C. E. Prevalence and characterization of *Salmonella* enterica serovar Weltevreden from imported seafood. **Food Microbiology**, v. 25, p. 29-35, 2008.

PRATES, D. F.; CAMACHO, N. N.; LIMA, A. S.; SILVA, W. P. Clostrídios Sulfito Redutores em Lingüiças Frescas e Morcelas Produzidas no sul do Rio Grande Do Sul. **Anais do XVII CIC e X ENPOS**. 2008.

RIBEIRO, A. L. M. S.; OLIVEIRA, G. M.; FERREIRA, V. M.; PEREIRA, M. M. D.; SILVA, P. P. O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista de Ciência Veterinária**, v.16, n. 3, p. 109-112, set./dez. 2009.

RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M. L.; MCLAUCHLIN, J.; FANELLI, I. Molecular Characterization and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 119-126, 2003.

RODRIGO, S.; ADESIYUNA, A.; ASGARALI, Z.; SWANSTON, W. Analysis for selected pathogens in water used during rinsing of broiler carcasses in small processing operations in Trinidad. **Food Microbiology**, v. 22, p. 609-614, 2005.

RODRIGUES, F.C. **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Industrialização do Mexilhão Cozido, Desconchado e Resfriado**. Monografia de Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Origem Sanitária. Universidade Castelo Branco. Lages, 2008.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 43-50, 2007.

ROTABAKK, B. T.; WYLLER, J.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas composition systems for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008.

RUSUL, G.; KHAIR, J.; RADU, S.; CHEAH, C. T.; YASSIN, R. Md. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 183-194, 1996.

SALÁN, E. O. **Tratamento térmico de mexilhões *Perna perna* como forma de assegurar a qualidade: validação do crescimento de**

***Bacillus cereus* e de *Staphylococcus aureus*.** Piracicaba, 2005. 88 p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo – USP.

SALÁN, E. O. ; GALVÃO, J. A. ; FURLAN, É. F. ; PORTO, E. ; GALLO, C. R. ; OETTERER, M. Quality of mussels cultivated and commercialized in Ubatuba, SP, Brazil – monitoration *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* growth after post-harvest processing. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p. 152-159, jan.-mar., 2008.

SANDEL, M. K.; MCKILLIP, J. L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v.15, p. 5-10, 2004.

SANTOS, T. M. **Avaliação Bacteriológica e Físico-Química (pH e N-BVT) da Carne de Piramutaba, *Brachyplatistoma vaillanti* (Siluriformes, Pimelodidae), Congelada Comercializada em Belo Horizonte – MG.** Belo Horizonte, MG. 2006. 27 p. Dissertação de mestrado. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

SCALICE, R. K. **Desenvolvimento de uma Família de Produtos Modulares para o Cultivo e Beneficiamento de Mexilhões.** Florianópolis, 2003. 252 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

SHABARINATH, S.; SANATH KUMAR, H.; KHUSHIRAMANI, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p. 227-233, 2007.

SHINOHARA, N. K. S.; BEZERRA, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* sp., importante agente patogênico vinculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do Padrão Coliformes a 45 °C e comparação da eficiência das técnicas dos

tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.2, p. 352 – 359, abr. jun., 2006.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 347 p.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterogenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO<sub>2</sub> in MAP systems: Advances in non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 92. p. 233-239, 2009.

SIVERTSVIK, M.;JEKSRUD, W.K.; ROSNES, J.T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities ad safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p. 107-127, 2002.

SIVERTSVIK, M.;JEKSRUD, W.K.; ROSNES, J.T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities ad safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p. 107-127, 2005.

SOCCOL, M.C.H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, n.4, p.569-580, 2003.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N.; JOZIC, S.; CURAC, D. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. **Environment International**, v. 25, n. 8, p. 991-1000,1999.

SOMBRIO, P. **Produção de Conserva de Mexilhões (*Perna perna*) em Embalagem Flexível – Avaliação Sensorial e Instrumental da Textura**. Florianópolis, SC, 2005. 72 p. Dissertação de mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

SOUZA, L. C.; IARIA, S. T.; PAIM, G. V. Salmonelas e coliformes

fecais em águas de bebida para animais. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n.5, p. 321-327, 1992.

STUMBO, C.R., **Thermobacteriology in Food Processing**. Academic Pres, 1973.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food Microbiology**, v. 24, p. 549-558, 2007.

SUPLICY, F. M. **Ensaios sobre a depuração do mexilhão *Perna perna* (L.,1758)**. 81p. Florianópolis, 1998. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

TAVARES, M.; MELLO, M. R. P.; CAMPOS, N. C.; MORAIS, C.; OSTINI, S. Proximate composition and caloric value of the mussel *Perna perna*, cultivated in Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 473-475, 1998.

TERUEL, B.; CORTEZ, L.; NEVES FILHO, L. Estudo comparativo do resfriamento de laranja valência com ar forçado e com água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.2; p. 174-178, 2003.

TOURON, A.; BERTHE, T.; GARGALA, G.; FOURNIER, M.; RATAJCZAK, M.; SERVAIS, P.; PETIT, F. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1441-1450, 2007.

TRONSDEN, T.; BRAATEN, T.; LUND, E.; EGGEN, A.E. Consumption of seafood—the influence of overweight and health beliefs. **Food Quality and Preference**, v.15, p.361–374, 2004.

VENUGOPAL, V. Biosensors in fish production and quality control. **Biosensors ; Bioelectronics**, v.17, p. 147-157, 2002.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática.** São Paulo, Livraria Varela, 2003.

WANG, L.; SUN, D. Evaluation of performance of slow air, air blast and water immersion cooling methods in the cooked meat industry by the infinite element method. **Journal of Food Engineering**, v. 51, p. 329-340, 2002.

WOOD, P. C. **Manual de Higiene de los Mariscos.** Zaragoza: Acribia, 1979. 79 p.