

**Aplicação de revestimentos edíveis à base de  
subprodutos da indústria do pescado na preservação  
de atum fresco**

**Milene Oliveira Vala**



**Aplicação de revestimentos edíveis à base de  
subprodutos da indústria do pescado na preservação de atum  
fresco**

**Milene Oliveira Vala**

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

Dissertação de Mestrado realizado sob a orientação da Doutora Maria Manuel  
Gil Figueiredo Leitão da Silva

**Título:** Aplicação de revestimentos edíveis à base de subprodutos da indústria do pescado na preservação de atum fresco

Copyright© Milene Oliveira Vala

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

**2016**

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

---

A concretização deste trabalho, só foi possível graças a várias pessoas que apoiaram, orientaram e incentivaram ao longo das várias etapas. Assim quero agradecer:

À minha orientadora, Professora Maria Manuela Gil, por todo o acompanhamento e disponibilidade na ajuda na execução deste trabalho. Bem como, pelos conhecimentos transmitidos, orientação e revisão crítica do trabalho.

A coorientadora, Ana Augusto, pela disponibilidade que sempre me dispensou nas minhas solicitações e revisão crítica do trabalho.

A todos os professores que de uma forma ou de outra ajudaram, em especial a professora Maria José Rodrigues que cedeu o frigorífico com ventilação para armazenar as amostras para os diferentes testes e a professora Teresa Batista que disponibilizou a pepsina para extração da gelatina.

Quero agradecer às empresas Profresco e Nigél por terem fornecido peles de salmão e de atum, respetivamente, para os diferentes estudos feitos.

Aos técnicos de laboratório pelo auxílio, disponibilidade e transmissão de conhecimento prestado sempre que necessitei.

Ao grupo MARE-IPLEIRIA por todo o apoio prestado, críticas e sugestões. Em especial, ao André Horta pela ajuda prestada nas análises microbiológicas e químicas e na ajuda na interpretação dos resultados.

A todos os meus amigos, que estiveram ao longo deste tempo e pela compreensão e paciência para as diversas ausências, mas que nunca me deixaram de apoiar ao longo desta caminhada.

Ao meu namorado, Bruno, apesar de se encontrar longe, nunca me deixou de apoiar e incentivar para a conclusão desta etapa.

Por último, não menos importante aos meus pais e família, pois sem eles nunca teria chegado a esta etapa, desde o início me incentivaram, apoiaram e compreenderam os períodos de ausência.

E um especial agradecimento a minha irmã, Patrícia, que sempre apoiou e acompanhou nesta aventura, mesmo estando a trabalhar, auxílio várias horas de dia, em noites e aos fins de semanas, pois sem a sua paciência e disponibilidade era quase impossível realizar todas as análises. E o fato de não estar sozinha nesta caminhada, deu-me força para continuar, agradeço todo o apoio e força que me transmitiu.

Hoje em dia, a indústria do pescado enfrenta muitos desafios e oportunidades, uma vez que o peixe é um alimento extremamente perecível em comparação com outros produtos. Por outro lado, este setor gera uma elevada quantidade de subprodutos, das operações tradicionais de filetagem ou de corte em postas. O aproveitamento desses subprodutos assume assim uma importância muito grande, pois minimiza os problemas de produção e custo unitário das matérias-primas. A maior justificação, porém é de ordem nutricional, pois os subprodutos são uma fonte de nutrientes de baixo custo. Estes subprodutos ou partes subvalorizadas são ricos em proteínas de alto valor biológico e ricos em ácidos gordos polinsaturados da série ómega 3. Acrescenta ainda a presente conjuntura económica, desfavorável às empresas do ramo alimentar portuguesas, principalmente às empresas de pescado (devido ao aumento progressivo no preço da matéria-prima) e, urge assim, valorizar os subprodutos e aumentar o tempo de vida útil do pescado fresco, no sentido de revitalizar o mercado.

A utilização de revestimentos comestíveis é um método promissor que permite proteger a qualidade dos produtos da pesca, aumentando o tempo de prateleira, sem comprometer a frescura.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de revestimentos à base de gelatina de pele de atum (*Thunnus obesus*) (5%) com incorporação de extrato de algas (*Codium spp* e *Fucus vesiculosus*) (1%) na qualidade físico-química e microbiológica de atum fresco, durante o armazenamento (12 dias a 4°C).

Foram desenvolvidas três soluções de revestimento à base de gelatina extraída de peles de atum (G), com ou sem incorporação de extratos de macroalgas (*Codium spp* (GC) e *Fucus vesiculosus* (GF)). O método de extração de gelatina a partir de peles de atum foi selecionado com base no rendimento do processo. Os revestimentos foram aplicados por aspersão aos lombos de atum fresco. Ao longo de 12 dias de armazenamento a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  foram efetuadas várias análises físicas e químicas às postas de atum para poder avaliar o efeito dos revestimentos na manutenção da qualidade do produto.

O trabalho realizado demonstrou que a metodologia de extração utilizada permite obter um rendimento na ordem dos 29%.

Os revestimentos desenvolvidos juntamente com uma temperatura de armazenamento de 4 °C mostram ser a boa opção para manter os parâmetros de tempo de

prateleira do atum durante 12 dias. O teor de azoto básico volátil e o número total de microrganismos apresentam valores inferiores aos limites máximos recomendados, a cor vermelha mantém-se durante mais dias e o valor de pH mantém-se inferior ao controlo para as amostras com revestimento ao fim dos 12 dias.

Em suma, a utilização de revestimentos à base de gelatina de peles de atum pode ser uma boa opção para prolongar o tempo de prateleira do atum refrigerado. Por outro lado, o aproveitamento dos subprodutos comestíveis das operações de transformação do atum assume uma importância muito grande, pois minimiza os problemas de produção e custo unitário das matérias-primas.

**Palavras-chave:** gelatina de peles de atum, revestimentos comestível, atum fresco, tempo de prateleira, extrato de algas

Nowadays, fish industry faces many challenges and opportunities, given that fish is an extremely perishable food compared to other products. On the other hand, this industry generates a high quantity of by-products, on filleting or slicing traditional operations. The use of these by-products thus assumes great importance because it minimizes the problems of production and unit cost of the raw materials. The biggest justification however is of nutritional order, once by-products are sources of low cost nutrients. These by-products or undervalued parts are rich in proteins of high biological value and polyunsaturated fat acids of the omega-3 series. It adds to the current economic conjecture, unfavorable to the Portuguese food sector companies, mainly to fish companies (due to the progressive price increase of raw materials), and urges thus to valuing the fish by-products and increase fresh fish shelf life, in order to revitalize the market.

The use of edible coatings is a promising method for protecting the quality of fishery products, increasing the shelf life, without compromising freshness.

The main aim of this study was to evaluate the effect of the application of gelatin-based tuna skin coatings (*Thunnus obesus*) (5%) with incorporation of macroalgae extracts (*Codium spp* and *Fucus vesiculosus*) (1%) on physico-chemical quality and microbiological of fresh tuna, during storage (12 days at 4 ° C).

Three coating solutions were developed, based on gelatin extracted from tuna skin (G), with addition or not of macroalgae extracts (*Codium spp* (CG) and *Fucus vesiculosus* (GF)). The gelatin extraction method from tuna skin was selected based on the yield of the process. Coatings were applied by spraying the fresh tuna fillets. During 12 days of storage at 4±1°C were performed several physical and chemical analyzes of the tuna fillets to assess the effect of the coatings in maintaining product quality.

The study showed that the extraction methodology gives a yield in the order of 29%.

The application of the developed coatings, on a storage temperature of 4 ° C, proved to be a good option for keeping tuna shelf life parameters for 12 days. The volatile basic nitrogen content and total number of microorganisms presents values were below the recommended maximum limits, the red color is maintained for longer and the pH value is maintained below the control for the samples coated after the 12 days.

In conclusion, the use of gelatin-based tuna skins coatings may be a good option to extend fresh tuna shelf life. On the other hand, the use of by-products of tuna processing operations is of great importance because it minimizes production problems and unit cost of raw materials.

**Keywords:** Tuna skin gelatin, edible coatings, fresh tuna, shelf life, algae extract

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	vi
Índice.....	viii
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1 Setor das pescas e consumo de pescado .....	1
1.2 Subprodutos da indústria do pescado.....	2
1.3 Interesse da espécie estudada - <i>Thunnus thynnus</i> .....	3
1.3.1 Alterações de qualidade do atum .....	5
1.4 Revestimentos edíveis.....	8
1.4.1 Utilização de gelatina em revestimentos.....	10
1.4.1.1 Gelatina de peixe.....	11
1.4.2 Aplicação de antioxidantes naturais provenientes de macroalgas em revestimentos edíveis.....	13
2. Objetivos e desenho experimental .....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
2.3 Desenho experimental.....	16
3. Materiais e Métodos.....	18
3.1 Atum e peles de atum.....	18
3.2 Obtenção de gelatina.....	18

3.2.1 Método de extração.....	18
3.2.2 Rendimento do processo de extração de gelatina .....	20
3.2.3 Caracterização da gelatina de atum.....	21
3.2.3.1 Teor de humidade .....	21
3.2.3.2 Teor de proteína .....	21
3.2.3.3 Teor de Cinzas .....	22
3.2.3.4 Determinação do pH .....	23
3.2.3.5 Avaliação da Cor.....	23
3.2.3.6 Força do gel.....	23
3.3. Extratos de algas .....	24
3.3.1 Algas <i>Codium spp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i> .....	24
3.3.2 Método de extração.....	24
3.4 Formulação e caracterização das soluções de revestimento à base de gelatina de peixe com adição de extratos de macroalgas.....	25
3.4.1 Preparação das soluções de revestimentos.....	25
3.4.2 Caracterização das soluções de revestimentos.....	25
3.4.2.1 pH.....	25
3.4.2.2 Avaliação da cor .....	25
3.4.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante .....	26
3.4.2.3.1 Quantificação de polifenóis totais (QTP) .....	26
3.4.2.3.2 Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH ...	26
3.5 Efeito dos revestimentos produzidos no tempo de prateleira de atum refrigerado.....	27
3.5.1 Aplicação das soluções de revestimento no atum fresco .....	27
3.5.2 Parâmetros físico-químicos.....	28
3.5.2.1 Teor de humidade .....	29
3.5.2.2 Determinação pH .....	29

3.5.2.3 Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	29
3.5.2.4 Teor de azoto básico volátil total (ABVT)	30
3.5.2.5 Avaliação da cor	31
3.5.2.6 Textura	31
3.5.3 Parâmetros microbiológicos	31
3.5.3.1 Contagem de Microrganismos totais a 30°C	31
3.6 Análise estatística	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1 Processo de extração de gelatina e rendimento de extração	33
4.2 Caracterização da gelatina	35
4.3 Caracterização das soluções de revestimento à base de gelatina de peixe com adição de extratos de macroalgas	39
4.4 Efeito dos revestimentos produzidos no tempo de prateleira de atum refrigerado	41
4.4.1 Parâmetros físico-químicos	41
4.4.1.1 Teor de Humidade	41
4.4.2 Determinação do pH	43
4.4.3 Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	45
4.4.4 Teor de azoto básico volátil total (ABVT)	46
4.4.5 Avaliação de Cor	49
4.4.6 Avaliação da textura	52
4.4.7 Microrganismos mesófilos totais a 30°C	53
5. Conclusão	55
6. Perspetivas futuras	57
Referências bibliográficas	58
Anexos	70

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica de espécies de atuns por zona FAO. Fonte: DGPA, 2008. ....	4
<b>Figura 2:</b> Fluxograma do processo de extração de gelatina de peles de atum resultantes do presente estudo. ....	19
<b>Figura 3:</b> Fluxograma da aplicação dos revestimentos no atum fresco.....	28
<b>Figura 4:</b> Fotografias das soluções de revestimentos. A- Gelatina; B- Gelatina com extrato de <i>Codium spp</i> ; C- Gelatina com extrato de <i>Fucus vesiculosus</i> .....	40
<b>Figura 5:</b> Teor de humidade ao longo do armazenamento das amostras de atum.....	42
<b>Figura 6:</b> pH ao longo do armazenamento das amostras de atum. ....	43
<b>Figura 7:</b> Os TBARS ao longo do armazenamento das amostras de atum .....	45
<b>Figura 8:</b> O ABVT ao longo do armazenamento das amostras de atum .....	47
<b>Figura 9:</b> Parâmetro a* ao longo do armazenamento das amostras de atum.....	49
<b>Figura 10:</b> A firmeza ao longo do armazenamento das amostras de atum.....	52
<b>Figura 11:</b> A contagem dos microrganismos mesófilos a 30°C ao longo do armazenamento das amostras de atum .....	53

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 1:</b> Composição nutricional da espécie de atum <i>Thunnus thynnus</i> por 100g de parte edível. ....	5
<b>Tabela 2:</b> Propriedades dos vários constituintes dos revestimentos comestíveis. ....	9
<b>Tabela 3:</b> Revisão de estudos com métodos de produção de gelatina extraída de pescado. ....	11
<b>Tabela 4:</b> Adição de antioxidantes à gelatina de peixe para preservação de peixe. ....	13
<b>Tabela 5:</b> Métodos de extração de gelatina. ....	19
<b>Tabela 6:</b> Soluções de revestimentos e as suas designações. ....	25
<b>Tabela 7:</b> Rendimentos obtidos nas diferentes extrações. ....	34
<b>Tabela 8:</b> Características físico-químicas da gelatina de pele de atum. ....	35
<b>Tabela 9:</b> Resultados da caracterização das soluções de revestimento. ....	39
<b>Tabela 10:</b> Amostras de atum ao longo do armazenamento, ao tempo 0, 6 e 12. ....	51



## 1.1 Setor das pescas e consumo de pescado

Desde há muito anos que o pescado faz parte da dieta alimentar de muitas regiões do mundo. Relativamente a Portugal este esteve sempre presente na alimentação da população, muito devido à localização geográfica onde se encontra, junto ao Oceano Atlântico, sendo este tradicionalmente consumido fresco, seco, salgado ou fumado (Fernandes, 2012).

Em 2011 o consumo de peixe em Portugal foi de 56,8 kg/per capita, ficando em terceiro lugar a nível mundial e em primeiro na União Europeia, sendo a média anual na EU-28 de 24,9 kg/per capita/ano (European Commission, 2016). As espécies mais consumidas em Portugal são o bacalhau e o atum, sendo o consumo de atum per capita/ano de 2,33kg (Willensen, 2003).

Por outro lado, o pescado é um dos produtos alimentares mais comercializados a nível mundial, tendo a sua produção/captura aumentado significativamente nos últimos anos. Segundo a FAO, em 2012 atingiu-se um novo recorde mundial de captura de pescado selvagem e de produção em aquacultura, com 158 milhões de toneladas, em comparação com as 155,7 milhões de toneladas no ano anterior (FAO, 2014). Este aumento de capturas e a própria expansão da aquacultura contribuiu para melhorar a dieta de muitas pessoas, particularmente em áreas rurais pobres, onde os alimentos muitas vezes carecem de nutrientes essenciais. Além disso, existe cada vez mais a procura, por parte dos consumidores, de alimentos ricos em fibras, com baixo teor de gorduras saturadas e gorduras insaturadas, dentro dos quais se engloba o pescado. No pescado o destaque vai para as proteínas de elevado valor biológico, o conteúdo lipídico muito variado, nomeadamente em ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 e vitamina A, D, E e complexo B. Por outro lado, é também um alimento de fácil digestão, devido à elevada quantidade de lisina presente na maior parte das espécies (acima de 95%, dependendo da espécie), que é o principal aminoácido iniciador do processo digestivo (Oetterer et al, 2006).

Apesar de todas estas vantagens nutricionais que um produto como o pescado tem, existem algumas limitações na sua comercialização. A evidente presença de gordura no tecido muscular promove uma série de reações em cadeia com oxigénio molecular

existente, o qual irá reagir com os lípidos insaturados e levará à formação da peroxidação lipídica (Ozogul et al, 2010). Este processo resulta em alterações organolépticas desagradáveis, nas quais se evidenciam o *flavour*, textura, aroma e cor do produto (Özogul et al, 2004). Para que tal não se suceda de forma acelerada são necessários processos e cuidados adicionais com o intuito de retardar as reações de deterioração. Este tópico será abordado posteriormente.

## 1.2 Subprodutos da indústria do pescado

O pescado capturado é maioritariamente utilizado para o consumo humano. Do total da captura mundial de pescado, cerca de 78% são comercializados como pescado fresco, congelado, em conserva e salgado, sendo os 21% restantes utilizados para fins não alimentares da população humana. Por outro lado, o processo de produção das indústrias de pescado gera um grande volume de subprodutos (por exemplo, pele, espinhas, barbatanas, cabeças e vísceras, aparas de operação da filetagem), o qual é geralmente considerado como resíduo, correspondendo a aproximadamente 7,3 milhões de toneladas/ano a nível mundial (Kelleher, 2005). Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) confirmam que nos últimos anos, o crescimento de subprodutos da indústria do pescado tem sido de aproximadamente 8% (Kelleher, 2005). Em Portugal estima-se que haja 128 mil toneladas de subprodutos da indústria do pescado congelado e da indústria conserveira, sem contar com o pescado que é rejeitado a bordo dos barcos e na lota (Lopes, 2014).

Os subprodutos são constituídos por proteínas de elevado valor biológico, perfil único de ácidos gordos (ómega-3: EPA e DHA), alguns minerais importantes e contendo várias moléculas com interesse farmacológico, cosmético, nutracêutico, entre outros (Cardoso et al, 2010; Nunes et al, 2008). Estes subprodutos são assim ricos em compostos com elevado potencial económico (óleos de peixe, proteínas, colagénio e enzimas) mas atualmente são pouco aproveitados pelo sector do pescado. O principal destino dos subprodutos da indústria de transformação de pescado é a sua venda a baixo custo para incorporação em rações animais, pela produção de farinha e óleo de pescado.

A valorização dos subprodutos está dependente do desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis que permitam a sua transformação em produtos comercializáveis e de elevado valor acrescentado (Slizytè et al, 2009). Em busca de alternativas viáveis para aproveitar estes subprodutos, vários produtos podem ser obtidos,

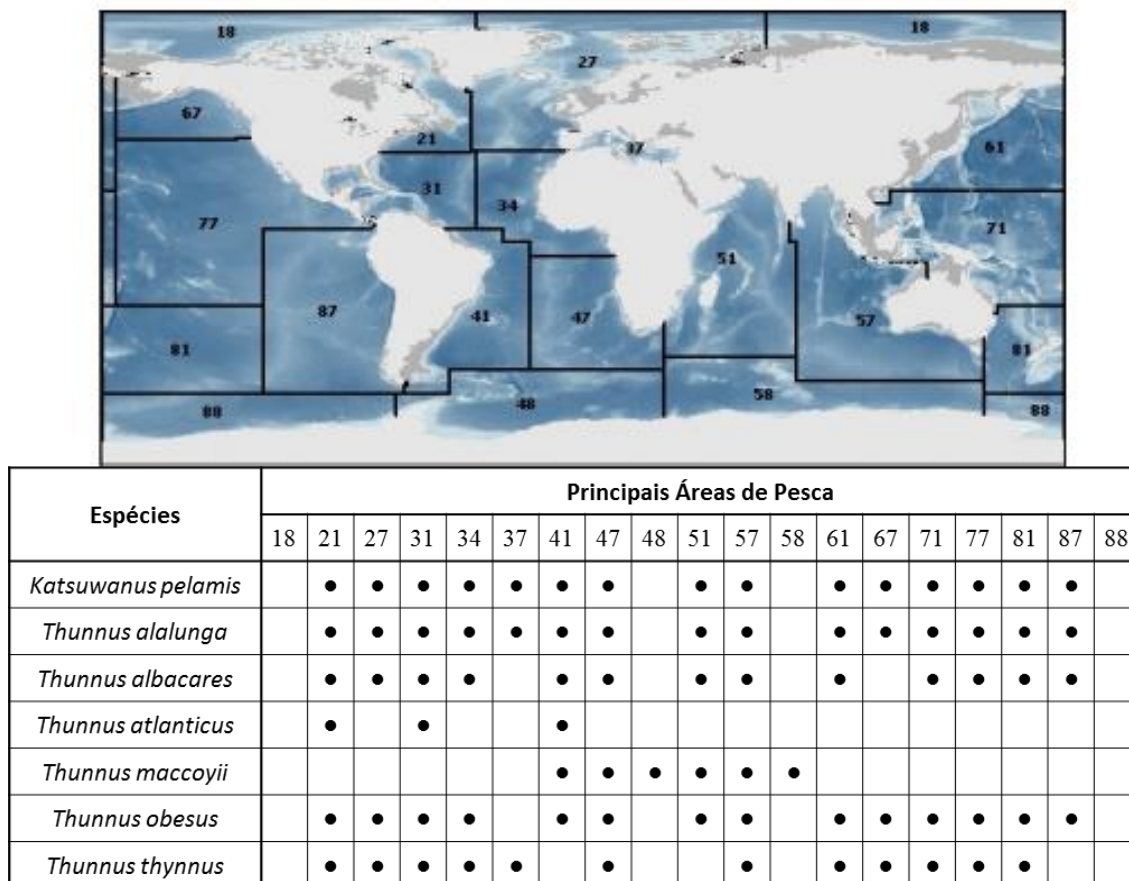
como por exemplo hidrolisados proteicos, colagénio e gelatina, com intuito de aumentar os lucros das empresas e reduzindo problemas ambientais (Bandeira, 2009; Binsi et al, 2009).

### **1.3 Interesse da espécie estudada - *Thunnus thynnus***

O atum é um peixe marinho pelágico, da família Scombridae, que normalmente se encontra junto à superfície em águas tropicais, subtropicais ou temperadas. É uma espécie em constante movimento, efetuando migrações de longas distâncias, a grande velocidade na busca de alimento ou para se reproduzir (Block et al, 2001; Fonteneau et al, 2005; Yang et al, 2015).

O atum pode nadar e caçar em águas frias, pois consegue manter a temperatura corporal superior à temperatura da água. O atum nada de boca aberta para bombear a sangue oxigenado e o metabolismo muscular gera calor constante. São os únicos, dos peixes ósseos, que têm a capacidade de controlar a temperatura corporal através de um sistema de termorregulação. Esta aptidão é-lhes conferida pela complexidade estrutural da rede sanguínea, permitindo o aquecimento do sangue arterial através do sangue venoso que flui nos tecidos musculares, mas também pela capacidade de controlar a passagem do fluxo sanguíneo nalguns dos vasos (DGPA, 2008). Devido às características de elevar a temperatura corporal podem ser encontrados num gradiente de temperaturas que oscila desde os 0,04° C até aos 31° C (Walli et al, 2009).

Segundo a FAO, em 2014 estabeleceu-se um novo recorde com a captura de mais de 7.7 milhões de toneladas de atum e espécies afins (FAO, 2016), sendo um dos mais comercializados no mundo, com 9% do valor total e o quarto da classificação em 2013, o que o torna de elevado valor económico (FAO, 2014). Em 2014, a captura global da espécie *Thunnus obesus* (uma das espécies mais comercializada em Portugal) foi de 411 743 toneladas (FAOa), estando representado na figura 1 a distribuição geográfica da espécie. Destacam-se as zonas de captura nas áreas da FAO: 34 (Atlântico Centro-Este), 51 (Oceano Índico Este), 61, 71 e 77 (Oceano Pacífico, Nordeste, Centro-Este e Centro-Oeste, respetivamente) como sendo as mais importantes a nível comercial (DGPA, 2008). Sendo o Japão com maior captura de *Thunnus obesus* (79 742 toneladas), devido ao consumo de sashimi (FAOa).



**Figura 1:** Distribuição geográfica de espécies de atuns por zona FAO. Fonte: DGPA, 2008.

Por outro lado, o atum é uma excelente fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais e possui uma baixa concentração em gorduras saturadas e uma elevada concentração de gorduras polinsaturadas (tabela 1). Estes ácidos gordos insaturados, como o ómega 3, são nutrientes que fazem baixar os níveis de colesterol plasmático, prevenindo o aparecimento de doenças cardiovasculares, podem ajudar a baixar a pressão sanguínea e ainda possuem propriedades anti-inflamatórias. Esta composição nutricional também contribui para o elevado interesse económico desta espécie.

**Tabela 1:** Composição nutricional da espécie de atum *Thunnus thynnus* por 100g de parte edível (adaptado: Bandarra et al., 2004).

<b>Componentes</b>	<b>Por 100g</b>
<b>Água (g)</b>	69,7
<b>Proteína (g)</b>	24,8
<b>Gordura total (g)</b>	3,5
<b>das quais saturadas (g)</b>	1,73
<b>omega-3 (g)</b>	0,69
<b>omega-6 (g)</b>	0,11
<b>Cinzas (g)</b>	1,7
<b>Vitamina A (mg)</b>	11
<b>Vitamina E (mg)</b>	0,6
<b>Potássio (mg)</b>	355
<b>Fósforo (mg)</b>	257

No entanto, apesar de todas as vantagens nutricionais e como já referido anteriormente, existem algumas limitações na comercialização de atum fresco. Uma delas prende-se com a peroxidação lipídica, que promove o aparecimento de odor desagradável e principalmente a descoloração do atum, limitando muito o tempo de prateleira deste produto e, principalmente, provocando a não compra do produto pelo consumidor final por falta de apelo do mesmo. Tal facto deve-se à existência de uma elevada percentagem de ácidos gordos polinsaturados, que estão particularmente presentes na carne de atum. Por outro lado, o atum tem um elevado teor de mioglobina que confere a cor vermelha púrpura, mas durante o armazenamento a baixas temperaturas ocorre descoloração da carne do atum, passando de vermelho púrpura a marrom escuro (Ogawa, 1999). Este facto é de extrema relevância em países como a Japão e os Estados Unidos da América em que o atum é tipicamente consumido fresco na forma de sashimi.

### **1.3.1 Alterações de qualidade do atum**

A qualidade da carne do atum geralmente é avaliada pela intensidade da cor vermelho brilhante do músculo, constituindo uma importante característica analisada pelo consumidor no momento da compra (Viriyarattanasak et al, 2008). A intensidade da cor

depende da concentração da mioglobina muscular, bem como de seu estado de redução e oxidação (Smulevich et al, 2007; Wongwichian et al, 2015). A mioglobina é uma proteína essencial para o armazenamento de oxigênio no músculo e a sua concentração pode variar em função da espécie, idade, nível de atividade física, bem como do tratamento efetuado ao pescado (Mancini e Hunt, 2005).

No entanto, durante o armazenamento a baixas temperaturas ocorre a descoloração da carne do atum, passando de vermelho púrpura a marrom (castanho) escuro, devido à oxidação da desoximioglobina ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a metamioglobina ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Ogawa, 1999; Viriyarattanasak et al, 2008). Esta passagem ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) é influenciada pela temperatura da carne, valor de pH, presença de sais, pressão parcial do oxigênio, e presença de gorduras insaturadas. Para que tal não se suceda de forma acelerada são necessários processos e cuidados adicionais com o intuito de retardar as reações (Ogawa, 1999).

Outro parâmetro analisado pelo consumidor no momento da compra é a textura do atum. A textura pode ser definida como uma manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e de superfície de um alimento percebidos por meios mecânicos e pelos sentidos da visão, audição, tato e sinestesia. É uma propriedade que pode ser avaliada por métodos sensoriais (diretamente pelo consumidor) ou instrumentalmente pelo texturômetro (Sveinsdottir et al, 2002; Szczesniak, 2002). As alterações na textura que ocorrem no atum são consequência de várias reações microbiológicas, químicas e autolíticas que ocorrem *post-mortem* (Huss, 1997).

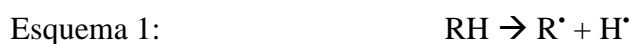
Após a morte do atum e após a degradação do ATP e da ocorrência do *rigor mortis*, proporcionam-se as condições para que ocorra a autólise dos tecidos. No processo de autólise ocorre a quebra de proteínas e lípidos devido à ação das enzimas proteolíticas e lipídicas nos tecidos. A hidrólise das proteínas gera aminoácidos livres, aminas, amônia entre outros, enquanto a hidrólise dos triglicéridos gera ácidos gordos livres (Beraquet e Lindo, 1985). Estas reações levam à perda de rigidez do músculo, o que por sua vez facilita a proliferação dos microrganismos (Delbarre-Ladrat et al, 2006; Sá, 2004). A oxidação lipídica é outra reação química responsável pela perda de qualidade do atum (Valero et al, 2012). Os ácidos gordos, componentes principais das gorduras, estão sujeitos a processos de oxidação, principalmente quando o seu grau de insaturação é elevado, como ocorre no atum. A avaliação do grau de oxidação da fração lipídica é assim um indicador do grau de deterioração do produto, pode ser utilizado para estimar o seu

prazo de validade e pode também provocar alterações na cor do atum (Bandarra et al., 1997).

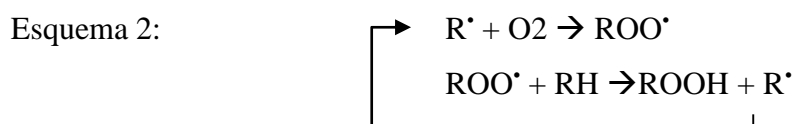
As gorduras são degradadas pelo oxigénio, podendo esta reação ser acelerada pelo calor, luz, substâncias orgânicas e inorgânicas (por exemplo cobre e ferro) e pela presença de bactérias, que em processos que envolvem hidrólise de triglicérides, podem acelerar as reações de oxidação dos lípidos com formação de aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos carboxílicos (Huss, 1995; Huss, 1997; Ozogul et al, 2010).

A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Koleva, 2007; Ramalho e Jorge, 2006):

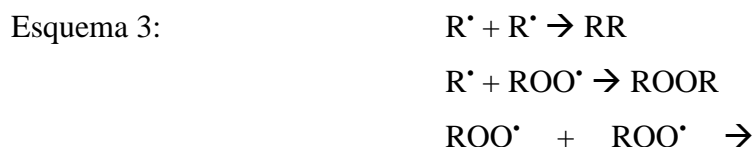
- Iniciação – dá-se a saída de um hidrogénio ( $H^{\bullet}$ ) na molécula do ácido gordo insaturado (RH), formando-se um radical livre ( $R^{\bullet}$ ) (esquema 1):



- Propagação – os radicais livres ( $R^{\bullet}$ ) que são mais suscetíveis ao ataque do oxigénio atmosférico ( $O_2$ ) convertem-se em outros radicais instáveis, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos ( $ROO^{\bullet}$ ) e hidroperóxidos ( $ROOH$ )) (esquema 2). Estes levam ao aparecimento de colorações amarelas ou castanhas no tecido do peixe, mas não conferem sabor. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando num processo autocatalítico.



- Terminação – os dois radicais livres ( $R^{\bullet}$  e  $ROO^{\bullet}$ ) compatibilização formando compostos estáveis (RR, ROOR), como compostos voláteis e não voláteis, que são considerados os produtos secundários da oxidação (esquema 3). Estes produtos são os responsáveis por causar cheiros desagradáveis (ranço) e coloração amarelada.



Os primeiros produtos da oxidação lipídica podem ser determinados através do índice de peróxidos. No entanto, o índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado

como indicador do grau de oxidação lipídica dos alimentos, nomeadamente do atum (Hocaoğlu et al, 2012). O índice TBA mede o teor de aldeído malónico que é um dos produtos da degradação dos hidroperóxidos lipídicos, formados durante o processo de oxidação dos ácidos gordos polinsaturados. Entende-se por TBA a quantidade de aldeído malónico, expresso em miligramas (mg) por 100 gramas do produto, pelo método de espectrofotometria.

#### **1.4 Revestimentos edíveis**

Como referido anteriormente o aumento por parte dos consumidores por um estilo de vida mais saudável tem levado a um maior consumo de pescado fresco, desafiando assim empresas e investigadores a encontrar processos de conservação alternativos que permitam prolongar o tempo de prateleira dos alimentos sem a necessidade do uso de aditivos. Os filmes e revestimentos comestíveis têm sido aplicados em alimentos em alternativa aos métodos de conservação tradicionais, embalagem a vácuo ou atmosfera modificada. Estes são aplicados à superfície dos alimentos, atuando como uma barreira mecânica, podendo assim controlar as trocas gasosas, a taxa respiratória, diminuir as perdas nutritivas, perda de humidade e prevenir o crescimento de microrganismos que levem à deterioração do alimento (Embuscado e Huber, 2009; Pinheiro et al, 2010).

Nos últimos 50 anos, os revestimentos comestíveis têm despertado um grande interesse junto dos investigadores, pois apresentam uma alternativa para reduzir os efeitos prejudiciais da degradação dos alimentos (Embuscado e Huber, 2009). O termo revestimento refere-se a uma suspensão ou emulsão aplicada por imersão ou aspersão na superfície do alimento que após a secagem forma uma camada protetora no alimento (Embuscado e Huber, 2009; Galus e Kadzinska, 2015; Pinheiro et al, 2010;).

Vários autores têm publicado trabalhos nesta área, utilizando revestimentos comestíveis para prolongamento do tempo de vida útil de frutas (Chiumarelli e Hubinger, 2012; Gol et al, 2013; Guerreiro et al, 2015; Park, 1999; Velickova et al, 2013), queijos (Mastromatteo et al, 2015; Ramos et al, 2012; Zhong et al, 2014;), peixes (Duan et al, 2010; Lu et al, 2010), marisco (Yuan et al, 2016; Wu, 2014) e carnes (Kanatt et al, 2013; Olaimat e Holley, 2015; Park et al, 2010).

Diversos têm sido os compostos utilizados no desenvolvimento de revestimentos comestíveis oriundos de diversas fontes naturais, sendo agrupados em polissacarídeos (e.g. quitosano, alginato, carragenina), proteínas (gelatina) e lípidos (ceras e gliceróis).

(Embuscado e Huber, 2009; Galus e Kadzinska, 2015; Pascall e Lin, 2013). Estes materiais caracterizam-se pela sua complexidade estrutural e diversidade funcional, podendo ser constituídos apenas por um elemento do grupo ou misturado com outros, formando revestimentos compostos (Embuscado e Huber, 2009; Gonçalves, 2007; Pascall e Lin, 2013). Geralmente recorre-se a substâncias como as gorduras, para reduzir a perda de água, polissacarídeos para controlar as trocas gasosas, e proteínas para conferir estabilidade mecânica (Embuscado e Huber, 2009). A funcionalidade e o comportamento dos revestimentos comestíveis dependem, principalmente, das suas propriedades mecânicas. Estas são definidas pela sua composição/formulação, processo de formação e método de aplicação no alimento. A seleção do revestimento deve ter em conta as características específicas do revestimento, o tipo de alimento a revestir e a função que deve desempenhar (tabela 2).

Para além dos materiais que são usados como base nos revestimentos comestíveis, podem-se adicionar compostos com outras finalidades, tais como antioxidantes, plastificantes, anti-escurecimento e antimicrobianos.

**Tabela 2:** Propriedades dos vários constituintes dos revestimentos comestíveis. **Fonte:** Beirão da Costa, 1998.

Material	Barreira ao vapor de água	Barreira ao oxigénio	Propriedade mecânica
Metilcelulose	Moderada	Moderada	Moderada
Colagénio	Fraca	Boa	Moderada
Gelatina	Fraca	Boa	—
Glúten	Moderada	Boa	Moderada
Caseína/Cera de abelha	Moderada	Boa	—
Cera de abelha	Boa	Fraca	Fraca
Pectina de baixo metóxilo	Moderada	Boa	Fraca

Segundo os autores Embuscado e Huber (2009), o revestimento comestível ideal para aumentar o tempo de prateleira do pescado, deve ter as seguintes características:

- Não conter componentes tóxicos e alergénicos;
- Fornecer estabilidade estrutural e evitar danos mecânicos durante a manipulação e transporte do alimento;

- Ter uma boa aderência à superfície dos alimentos, fornecendo uma cobertura uniforme;
- Controlar a migração de água do alimento;
- Fornecer a semi-permeabilidade para manter o equilíbrio interno dos gases;
- Evitar a perda ou absorção de componentes que destabilizem o aroma, o sabor, a composição nutricional e características organolépticas necessárias para a aceitação do consumidor;
- Fornecer estabilidade da superfície bioquímica e microbiana enquanto protege contra a contaminação, a proliferação dos microrganismos, e outros tipos de degradação;
- Manter ou melhorar a estética e atributos sensoriais (aparência, sabor etc.) do alimento;
- Ter a capacidade de incorporar aditivos desejáveis, antioxidantes e agentes antimicrobianos.

#### **1.4.1 Utilização de gelatina em revestimentos**

A gelatina é um ingrediente natural, uma proteína pura obtida a partir de matérias-primas de origem animal que contenham colagénio. É obtida pela hidrólise do colagénio quando aquecido acima dos 40°C, em condições ácidas ou alcalinas (Alfaro, 2008; Embuscado e Huber, 2009; Gómez-Guillén et al, 2009,).

As propriedades físico-químicas da gelatina são influenciadas pela espécie e idade do animal e pelo processo de extração, influenciando também a sua aplicabilidade, pois a concentração inicial de colagénio é diferente de espécie para espécie de animal, assim variando o conteúdo de aminoácidos disponíveis (Binsi et al, 2009).

A capacidade de formar um gel é uma importante propriedade da gelatina. A gelatina incha quando é colocada em água fria, podendo absorver 5 a 10 vezes o seu peso em água. Quando aquecida em temperaturas acima do ponto de fusão, a gelatina hidrata e dissolve-se (gelatinização) e, quando exposta a temperaturas mais baixas forma um gel (gelificação). Esta conversão sol-gel é reversível e pode ser repetida (Ferreira, 2013).

Na indústria alimentar, a gelatina é utilizada em confeções (principalmente para fornecer mastigabilidade, textura e estabilização de espuma), em suspensões de baixo teor de gordura (para fornecer cremosidade), na indústria de laticínios (para proporcionar a

estabilização e textura), na indústria da panificação (emulsificação, gelificação e estabilização), e na indústria de produtos cárneos (ligação da água) (Karim e Bhat, 2009).

A produção mundial de gelatina ronda as 32mil toneladas e na Europa a gelatina produzida provem de pele de porco (80%), do tecido conjuntivo da pele de vaca (15%) e ossos de porco e de vaca e peixes (5%) (GME, 2015; Gómez-Guillén et al, 2009). No entanto, hoje em dia existe um interesse crescente na produção de gelatina a partir de peixe, devido aos subprodutos gerados pelas indústrias de transformação de pescado (Cho et al, 2005).

#### 1.4.1.1 Gelatina de peixe

A gelatina de peixe é uma alternativa à gelatina de porco e bovina. Devido à crise desencadeada pelos surtos da doença BSE (encefalopatia espongiforme bovina), algumas restrições alimentares de consumidores e por motivos de crenças religiosas (Judaísmo e Islamismo), o recurso a esta fonte para a obtenção de gelatina tem vindo a ser explorado (Cho et al, 2005; Gilsean e Ross-Murphy, 2000; Gómez-Guillén et al, 2009)

As peles e os ossos de peixe são constituídos principalmente por colagénio, sendo um dos subprodutos da indústria de transformação de pescado. Na indústria, o processo de filetagem de peixe pode gerar 30% de resíduos e a sua não valorização causa desperdício e poluição, além de que se perde uma fonte de obtenção de gelatina (Gómez-Guillén et al, 2009, Karim e Bhat, 2009; Mariod e Adam, 2013).

Diversos autores têm estudado processos de extração e caracterização de gelatina de peixe. Na tabela 3 estão representados alguns exemplos, com destaque pelo trabalho do autor Haddar et al, (2012), que extraiu gelatina de peles de atum com recurso a pepsina, melhorando o rendimento de gelatina.

**Tabela 3:** Revisão de estudos com métodos de produção de gelatina extraída de pescado.

Espécie	Referência
Bacalhau ( <i>Gadus morhua</i> ),	Gudmundsson e Hafsteinsson, 1997; Kolodziejaska et al, 2008
Solha ( <i>Platichthys flesus</i> )	Fernández-Díaz et al, 2003

<b>Polaco do Alasca</b> ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	Chiou et al, 2006; Zhou e Regenstein, 2005
<b>Areiro</b> ( <i>Lepidorhombus boscii</i> ), <b>pescada</b> ( <i>Merluccius merluccius</i> ),	Fernández-Díaz et al, 2001; Gómez-Guillén et al, 2002; Sarabia et al, 2000
<b>Carapau</b> ( <i>Trachurus trachurus</i> )	Badii e Howell, 2006
<b>Salmão</b> ( <i>Salmo salar</i> )	Arnesen e Gildberg, 2007; Kolodziejaska et al, 2008
<b>Atum</b> ( <i>Thunnus albacares</i> )	Kaewdang e Benjakul, 2015; Haddar et al, 2012; Cho et al, 2005
<b>Atum bonito</b> ( <i>Katsuwonus pelamis</i> )	Shyni et al, 2014
<b>Tubarão azul</b> ( <i>Prionace glauca</i> ) <b>Tubarão</b> ( <i>Scoliodon sorrakowah</i> )	Yoshimura et al, 2000 Shyni et al, 2014
<b>Arenque</b> ( <i>Clupea harengus</i> )	Kolodziejaska et al, 2008
<b>Linguado</b> ( <i>Solea vulgaris</i> )	Fernández-Díaz et al, 2001; Gómez-Guillén et al, 2002
<b>Lula</b> ( <i>Loligo vulgaris</i> )	Abdelmalek et al, 2016
<b>Robalo</b>	Sae-Leaw et al, 2016

O processo de extração de gelatina divide-se em três etapas principais: pré-tratamento alcalino, seguido de tratamento ácido da matéria-prima e extração da gelatina. O tratamento alcalino remove a matéria não colagénio e o tratamento ácido remove o inchaço do colagénio. Por fim, a extração da gelatina através do aquecimento, tem como objetivo o rompimento das ligações não covalentes e destabilizar a estrutura da proteína, levando a conversão do colagénio em gelatina (Alfaro, 2008; Karim e Bhat, 2009).

De realçar que este processo tem que obedecer ao Regulamento (CE) n.º 853/2004 que estabelece as condições gerais para a produção de gelatina comestível (incluindo gelatina de peixe), abrangendo todos os aspetos desde a origem da matérias-primas até transporte do produto final. Os requisitos microbiológicos para a gelatina e colagénio hidrolisado estão também abrangidos pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007. A combinação de todos estes regulamentos define um quadro muito claro para a produção de gelatina de qualidade.

### 1.4.2 Aplicação de antioxidantes naturais provenientes de macroalgas em revestimentos edíveis

Nos últimos anos, tem havido pressão para que a indústria de alimentos substitua a utilização de antioxidantes sintéticos, que têm sido utilizados com bastante eficiência, por aditivos naturais, isolados a partir de frutos, plantas aromáticas, chá, sementes, entre outros (Choe e Min, 2009; Lidon e Silvestre, 2007).

Os antioxidantes são utilizados nos produtos alimentares para retardarem ou inibirem a oxidação de lípidos e outras biomoléculas, bloqueando a capacidade oxidante dos radicais livres. Utilizam dois mecanismos para retardar e inibir a oxidação, sendo o primeiro por inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo por eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, através da doação de átomos de hidrogénio, interrompendo as reações de proliferação oxidativa em cadeia (Basu et al, 1999; Lidon e Silvestre, 2007; Soares, 2002).

Diversos autores têm desenvolvido trabalhos com aplicação de antioxidantes em gelatina de peixe para aumento do tempo de vida de prateleira dos produtos alimentares (tabela 4).

**Tabela 4:** Adição de antioxidantes à gelatina de peixe para preservação de peixe.

<b>Espécie utilizada para produção de gelatina</b>	<b>Antioxidante</b>	<b>Referência</b>
<b>Atum</b>	Extrato de orégãos e alecrim	Gómez-Estaca et al, 2009a
	Extrato de alga castanha ( <i>Cystoseira barbata</i> )	Haddar et al, 2012

<b>Linguado (<i>Solea spp.</i>)</b>	Borago	Gómez-Estaca et al, 2009b
<b>Catalufa (<i>Catalufa mota purpúreo</i>)</b>	Extrato de alga castanha ( <i>Turbinaria ornata</i> )	Rattaya et al, 2009
<b>Carpa prateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)</b>	Extrato de chá verde	Wu et al, 2013

Nas últimas décadas, as macroalgas e os seus extratos têm sido estudados como novas fontes de compostos bioativos, nomeadamente por possuírem elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana (Chew et al, 2008; Díaz-Rubio et al, 2008; Heo et al, 2005; Salvador, 2007). As algas marinhas representam uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais e antimicrobianos, uma vez que faz parte do sistema de defesa das algas devido às variações de intensidade de luz e concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e contra bactérias e fungos (González del Val et al, 2001; Matsukawa et al, 1997; Shanmughapriya et al, 2008)

A macroalga *Codium spp* conhecida como uma alga verde esponjosa, da família *Codiaceae*, é uma fonte importante de galactanos sulfatados e compostos com propriedades bioativas, tais como antioxidantes, anti tumoral e anti-obesidade, o que a torna de interesse para a indústria alimentar. Augusto et al (2016) verificaram que a aplicação de uma solução de extrato da alga *Codium tomentosum* em maçãs fatiadas minimamente processadas e refrigeradas, permite a manutenção da qualidade durante mais tempo.

A alga castanha *Fucus vesiculous* é da família da Fucaceae, cresce nas rochas na zona médio-litoral e intertidal. É composta por florotaninas, um grupo de polifenóis, que ajudam a proteger o organismo produtor contra a radiação ultravioleta, proteção contra herbívoros e agir contra microrganismos patogénicos (Balboa et al, 2013; Parys et al, 2010).

Um estudo, que se encontra patenteado com nº PT 104814, com o título gelo suplementado com algas edíveis e/ou produtos derivados destas, verificou que a qualidade de filetes de sardinha pode ser mantida durante mais tempo quando conservadas em gelo suplementado com extrato da alga *Fucus spiralis*.



## 2. Objetivos e desenho experimental

---

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a aplicação de revestimentos edíveis à base de gelatina de atum, para aumento do tempo de vida útil do atum refrigerado.

### 2.2 Objetivos específicos

- Valorização dos subprodutos da indústria do pescado, peles de atum;
- Otimização do processo de extração de gelatina a partir pele de atum;
- Caracterização físico-química da gelatina extraída;
- Extração dos compostos de interesse das macroalgas *Codium spp.* e *Fucus vesiculosus*;
- Formulação de revestimentos à base de gelatina de atum com a incorporação de extratos de macroalgas, *Codium spp* e *Fucus vesiculosus*;
- Aplicação das diferentes formulações de revestimentos em atum fresco e avaliação da sua qualidade ao longo de 12 dias à temperatura de refrigeração (4°C).

### 2.3 Desenho experimental

O trabalho compreendeu 2 fases:

#### **1ª fase – Otimização do processo de extração de gelatina de pele de atum**

Na primeira fase do trabalho foram testados diferentes processos de extração de gelatina de modo obter-se o maior rendimento de gelatina a partir das peles de atum. Posteriormente e utilizando o método de extração selecionado (com base no rendimento obtido) caracterizou-se a gelatina em função do teor de humidade, teor de proteína, teor de cinzas, pH, cor e força do gel.

**2ª fase – Aplicação de revestimento edível de gelatina de atum com adição de extrato de macroalgas**

Na segunda fase do trabalho, foram testadas diferentes formulações de revestimentos à base de gelatina de atum com adição de extrato de macroalgas, em atum refrigerado. Os revestimentos foram aplicados por aspersão e as amostras de atum armazenadas a 4°C, durante 12 dias. A avaliação físico-química do atum fresco foi realizada ao tempo 0, 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento, sendo analisados o teor de humidade, pH, TBARS, ABVT, cor, textura e microrganismos totais a 30°C.

## 3. Materiais e Métodos

---

### 3.1 Atum e peles de atum

O atum (*Thunnus obesus*, capturado no Atlântico Centro Este) foi cedido pela empresa Omnifish, situada em Peniche. O atum foi adquirido já cortado em lombos entre 0,5 e 2 cm de espessura e com um peso entre 100 e 200 gramas (g), no mês de Setembro de 2015.

As peles de atum (*Thunnus albacares*) refrigeradas foram cedidas pela empresa Nigel, situada em Peniche. Estas foram recolhidas após o processamento de atum e acondicionadas à temperatura de refrigeração, 4°C. Os pedaços de músculo junto à pele foram removidos manualmente e a pele foi armazenada em sacos de plástico a  $-13\pm 1^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização.

### 3.2 Obtenção de gelatina

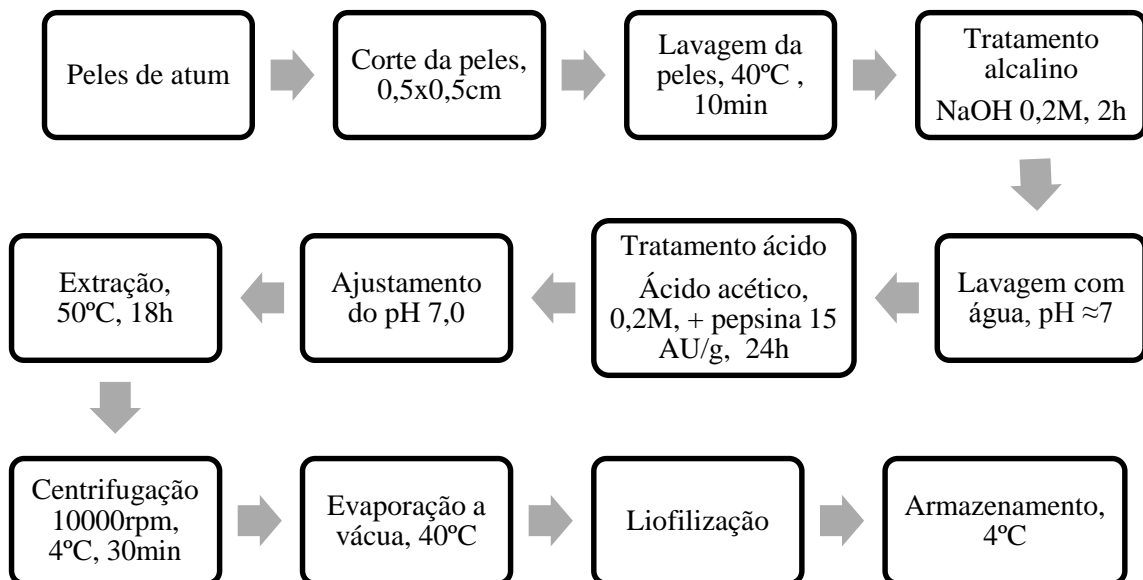
#### 3.2.1 Método de extração

Para a extração de gelatina realizou-se vários métodos de extração, variando o pré-tratamento alcalino, tratamento ácido e temperatura de extração como pode-se verificar na tabela 5. O método selecionado foi F, estando descrito na figura 2.

A extração da gelatina procedeu-se de acordo com Haddar et al (2012) e Shyni et al (2014), com algumas modificações. O fluxograma do processo de extração de gelatina encontra-se representado na figura 2.

**Tabela 5:** Métodos de extração de gelatina.

Processo	Pré-tratamento	Tratamento
A	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M 23±1°C, 12h, 2 vezes
B	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,2M 23±1°C, 12h, 2 vezes
C	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M 4±1°C, 12h, 2 vezes
D	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,2M 4±1°C, 12h, 2 vezes
E	NaOH 0,04M 27±0,5°C, 30 min	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,12M 27±0,5°C, 30 min C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,005M 27±0,5°C, 30 min
F	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M + 15AU/g pepsina 4±1°C, 12h, 2 vezes
G	NaOH 0,2M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M + 15AU/g pepsina 4±1°C, 24h

**Figura 2:** Fluxograma do processo de extração de gelatina de peles de atum resultantes do presente estudo.

As peles de atum foram descongeladas a 4°C e posteriormente cortadas em pedaços de aproximadamente 0,5 x0,5 cm. Foram lavadas com água à temperatura entre 38 e 40°C, durante 10 minutos (min) com agitação, com o intuito de remover o material supérfluo e redução do teor de gordura. Posteriormente, foram colocadas em hidróxido de sódio a 0,2M numa proporção de 1:10 (pele/solução), durante 2 horas (h) à temperatura de 27±1°C com agitação contínua (tratamento alcalino). Após 1 h a solução foi renovada, permitindo a remoção de proteínas e pigmentos não colagénios. Após a lavagem alcalina da pele, esta foi lavada em água corrente até a água da lavagem apresentar um pH neutro ou ligeiramente básico, pH 7 ou até pH 8, respetivamente.

De seguida, adicionou-se ácido acético a 0,2M, a uma proporção 1:10 (g por volume), à temperatura 4±1°C, durante 24 h, em agitação, com objetivo de expandir o material na matriz do colagénio. A pepsina (1:1000) foi adicionada nesta fase, a uma concentração de 15AU/g de pele. Após 24 h, o pH da mistura foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio a 10M. De modo a terminar a atividade da hidrólise da pepsina, a mistura foi colocada novamente à temperatura 4±1°C durante 1 h. Foram realizados ensaios com e sem pepsina.

Para finalizar, a extração da gelatina foi realizada a uma temperatura de 50±3°C durante 18 h. Seguiu-se uma filtração com filtro Whatman nº 4. O filtrado foi depois centrifugado (10000 rpm, 30 min, 4°C) (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) para remoção do material insolúvel. Para concentrar a gelatina, esta foi sujeita a evaporação a vácuo (Laborota 4000-efficient, Heidolph) à temperatura de 40°C. A gelatina em pó, obtida após liofilização (SupplyLab, Portugal) foi armazenada à temperatura de 4°C até a sua utilização.

### 3.2.2 Rendimento do processo de extração de gelatina

O rendimento do processo de extração de gelatina foi calculado de acordo com a seguinte equação (Haddar et al, 2012):

$$(Eq. 1) \quad \text{Rendimento (g/100g)} = \frac{\text{peso da gelatina seca (g)}}{\text{peso da pele de atum (g)}} \times 100$$

### 3.2.3 Caracterização da gelatina de atum

Todas as análises realizadas para a caracterização da gelatina de pele de atum foram realizadas em triplicado.

#### 3.2.3.1 Teor de humidade

O teor de humidade da gelatina foi determinado de acordo com o método descrito por AOAC (2000).

Inicialmente colocaram-se os cadinhos vazios na estufa (Memmert, Alemanha) a 105°C durante 3 h, e de seguida no exsiccador. Para a determinação da gelatina, pesou-se 0,5 g de amostra para um cadinho e colocou-se na estufa a 105°C até atingir um peso contante, até uma diferença de 0,001 g. O teor de humidade em base húmida foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$(Eq. 2) \quad \text{Teor de humidade (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

Onde:

$m_1$  – massa da amostra antes da secagem (g);

$m_2$  – massa da amostra depois da secagem (g).

#### 3.2.3.2 Teor de proteína

Para determinar o teor de proteína bruta da gelatina seguiu-se o método de Kjeldahl, segundo a Norma Portuguesa 4488:2009.

Este método tem com principais processos a digestão ácida, destilação e por último a titulação da amostra. A digestão inicia-se com a adição de ácido sulfúrico a 96% à amostra juntamente com pastilhas de selénio, a digestão é realizada no digestor de Kjeldahl (Foss, Digestor 2006) com dois ciclos a altas temperaturas. Após a digestão da amostra procedeu-se a uma destilação da mesma com hidróxido de sódio a 40% e ácido bórico com indicador num destilador automático de Kjeldahl (Foss, Kjeltec™ 2100). Por último, foi realizada uma titulação com ácido clorídrico 0,1N como titulante. O ponto de viragem foi definido quando a solução mudou de verde para cinzento.

Para calcular a proteína bruta da gelatina utilizou-se o fator de conversão de 5,4, de acordo com Haddar et al (2012). O teor de proteína é expresso em g/ 100 g de parte edível e foi determinada de acordo com a equação:

$$(Eq. 3) \quad Proteína\ bruta = NT \times F$$

Onde:

NT – teor de azoto total

F – fator de conversão

O teor de azoto total foi calculado segundo a seguinte equação:

$$(Eq. 4) \quad NT = \left[ \frac{0,014 \times (V_a - V_b) \times 0,1}{m} \right] \times 100$$

Onde:

V<sub>a</sub>: volume de titulante gasto para a amostra (ml);

V<sub>b</sub>: volume de titulante gasto para o branco (ml);

m: massa da amostra (g);

0,014 o equivalente em grama presente em 1ml de HCl (0,1 N).

### 3.2.3.3 Teor de Cinzas

O teor de cinzas totais foi determinado segundo o método descrito na Norma Portuguesa 2032:1988, com algumas alterações.

Adicionou-se 3 g de gelatina num cadinho, de seguida foi incinerada a 550°C durante 5 h na mufla (Nabertherm, Alemanha). Previamente os cadinhos foram à mufla a 550°C durante 2 h.

O teor de cinza total da gelatina foi calculado pela seguinte equação:

$$(Eq. 5) \quad Teor\ de\ cinza\ (\%) = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100$$

Onde:

m<sub>1</sub> – massa do cadinho (g);

m<sub>2</sub> – massa da amostra (g);

$m_3$  – massa do cadinho com a cinza (g).

#### **3.2.3.4 Determinação do pH**

Para a determinação do pH da gelatina foi realizada conforme o método de Alfaro et al (2014) e Haddar et al (2012). Foi necessário preparar uma solução de gelatina a 1% com água destilada a 60°C, com agitação contínua, durante 30 min.

Posteriormente as soluções foram medidas num potenciômetro (SympHony SP7CP, VWR, Estados Unidos), previamente calibrado, mergulhando o eletrodo na solução de gelatina.

#### **3.2.3.5 Avaliação da Cor**

A medição da cor foi realizada diretamente pela leitura das coordenadas Cielab ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) nas amostras, utilizando um colorímetro (Konica Minolta CR400, Japão), que consiste num aparelho de medição, com uma área de diâmetro de 8 milímetros (mm) de medição e um processador de dados. Antes da medição, o colorímetro foi calibrado por uma cerâmica branca. O valor de  $L^*$  representa a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco), o valor  $a^*$  varia entre -60 (verde) e +60 (vermelho) e o valor  $b^*$  varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo) (Sant'Anna et al, 2013).

A medição de cor da solução a 6,67% foi realizada de acordo com o método Kaewdang e Benjakul (2015), recorrendo-se a uma célula para líquidos (CR-A504), colocando-se no fundo uma base branca. Foram realizadas 5 leituras com um ângulo de 90° à superfície de cada solução de revestimento.

#### **3.2.3.6 Força do gel**

A força do gel da gelatina foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Haddar et al (2012).

Após a preparação da solução de gelatina a 6,67%, esta foi subtida à temperatura de 7°C, durante 16 a 18 h (tempo de maturação).

A resistência do gel da gelatina de peles de atum foi determinada com um texturômetro (TA.XT.Plus, Texture Analyser), de acordo com o guia de aplicação do

software para gel de gelatina, “Determination of gel strength (Bloom Value) of gelatin according to the Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) and Gelatin Manufacturers Europe (GME) testing standard”, com uma sonda 0,5” (P/0,5, Cylinder Probe) de velocidade máxima de 1 mm/s. A força máxima de (g) foi determinada quando a sonda penetrou até uma profundidade de 4 mm da superfície do gel de gelatina.

A força do gel foi expressa a força máxima (g), necessária para pressionar o êmbolo para desviar a superfície do gel de 4 mm sem quebrá-lo.

### **3.3. Extratos de algas**

#### **3.3.1 Algas *Codium spp* e *Fucus vesiculosus***

A alga *Codium spp.* foi recolhida em Setembro de 2015, na praia do Abalo em Peniche, Portugal. No laboratório, as algas foram lavadas com água destilada a fim de remover organismos invertebrados e outros detritos presentes nas algas. Depois da lavagem a alga foi liofilizada, embalada e acondicionada à temperatura ambiente.

A alga *Fucus vesiculosus* foi fornecida pela empresa Algaplus, liofilizada e triturada.

#### **3.3.2 Método de extração**

O extrato de alga foi preparado de acordo com o método utilizado por Augusto et al (2015), a partir de um solvente polar.

Os extratos foram obtidos a partir da alga anteriormente liofilizada e com recurso a um solvente polar. Foram pesados 2 g da alga liofilizada e adicionou-se água e etanol a uma proporção de 3:1 perfazendo 30 ml. A solução obtida ficou em agitação durante 6 h, protegida da luz e à temperatura ambiente.

Posteriormente realizou-se uma centrifugação a 2000 rpm, durante 10 min à temperatura de 4°C. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi sujeito a filtração (filtro Whatman de nº 4) de modo a retirar algumas partículas. De seguida realizou-se uma evaporação a vácuo à temperatura 30°C, para evaporação do etanol, prosseguido de liofilização, para remoção da água, obtendo-se o extrato de alga sólido.

### 3.4 Formulação e caracterização das soluções de revestimento à base de gelatina de peixe com adição de extratos de macroalgas

#### 3.4.1 Preparação das soluções de revestimentos

Foram preparadas 3 soluções de revestimento diferentes como apresentado na tabela 6. O glicerol foi adicionado como plastificante, para melhorar as propriedades físicas/mecânicas, como flexibilidade, força e resistência do revestimento (Gómez-Guillén et al, 2007, Mali et al, 2006). Para preparar as soluções de revestimentos com extrato de alga *Codium* spp (GC) e *Fucus vesiculosus* (GF), dissolveu-se a gelatina em água destilada a 55°C, mantendo-se em agitação durante 30 min. Após 20 min adicionou-se o glicerol a 25% (g/100g de gelatina), e o extrato de alga para uma percentagem final de 1%. No caso da solução de revestimento sem extrato (controlo) foi realizado o mesmo procedimento com exceção da etapa de adição do extrato de alga.

**Tabela 6:** Soluções de revestimentos e as suas designações.

Designação	Soluções de revestimento
<b>G</b>	5% Gelatina de pele de atum + 25% glicerol
<b>GC</b>	5% Gelatina de pele de atum + 1% extrato <i>Codium spp</i> + 25% glicerol
<b>GF</b>	5% Gelatina de pele de atum + 1% extrato <i>Fucus vesiculosus</i> + 25% glicerol

#### 3.4.2 Caracterização das soluções de revestimentos

##### 3.4.2.1 pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico. A sonda do potenciómetro foi mergulhada diretamente na solução de revestimento. Foram efetuadas 3 determinações em cada solução de revestimento.

##### 3.4.2.2 Avaliação da cor

Para a medição de cor procedeu-se de acordo com o método descrito no ponto 3.2.3.5, mas utilizando as diferentes soluções de revestimento formuladas.

A diferença de cor ( $\Delta E$ ) também foi calculada pela diferença entre as soluções de gelatinas (GC-G; GF-G), pela seguinte fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

### 3.4.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante

Foi efetuado um extrato do revestimento para posterior quantificação dos polifenóis totais e a avaliação da capacidade de redução de DPPH. Foi adicionado 8 ml de metanol a 1 g de revestimento (previamente liofilizado) com agitação permanente em vortex durante 30 min. Posteriormente, centrifugou-se a 5000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado com um filtro nº4. Repetiu-se este procedimento mais duas vezes, adicionando-se 8 ml de metanol ao precipitado. O sobrenadante foi evaporado e ressuspenso em DMSO (Dimetilsulfóxido) numa concentração 100 mg/ml.

#### 3.4.2.3.1 Quantificação de polifenóis totais (QTP)

A quantificação de polifenóis foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu adaptado por Silva et al (2013). O ácido gálico foi utilizado como padrão e os valores expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico/ml de amostra. Num microtubo adicionou-se 158  $\mu$ l de água destilada, 2  $\mu$ l de amostra e 10  $\mu$ l de reagente de *Folin-Ciocalteu*. Após 2 min de repouso, adicionou-se 30  $\mu$ l de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20% (p/v). Incubou-se durante 60 min, no escuro à temperatura ambiente. Mediu-se a absorvância a 755 nm num leitor de placas (Biotek Synergy H1). Para a quantificação total de polifenóis foram ainda realizadas cinco soluções de ácido gálico (com concentrações de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 e 1 mg/ml) como padrões para realizar a curva de calibração. A QTP foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico.ml<sup>-1</sup> de amostra.

#### 3.4.2.3.2 Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

Para a avaliação da capacidade de redução de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) recorreu-se ao método descrito por Silva et al (2013).

Foi preparada uma solução de 0,1 mM de DPPH em etanol absoluto. Para a reação final misturaram-se 2 µl de amostra em 198 µl da solução de DPPH. Após homogeneização das misturas, estas foram incubadas durante 30 min, no escuro à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm, sendo que quando as misturas apresentavam a evolução da cor violeta para amarelo ocorrera a inativação dos radicais livres pela amostra. A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através da equação:

$$(Eq. 6) \quad \% \text{ Redução DPPH} = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \times 100$$

Onde:

Abs amostra: absorvância da solução de DPPH e amostra

Abs branco: absorvância de solvente (etanol) com amostra

Abs controle: absorvância de solução de DPPH com solvente (etanol)

### **3.5 Efeito dos revestimentos produzidos no tempo de prateleira de atum refrigerado**

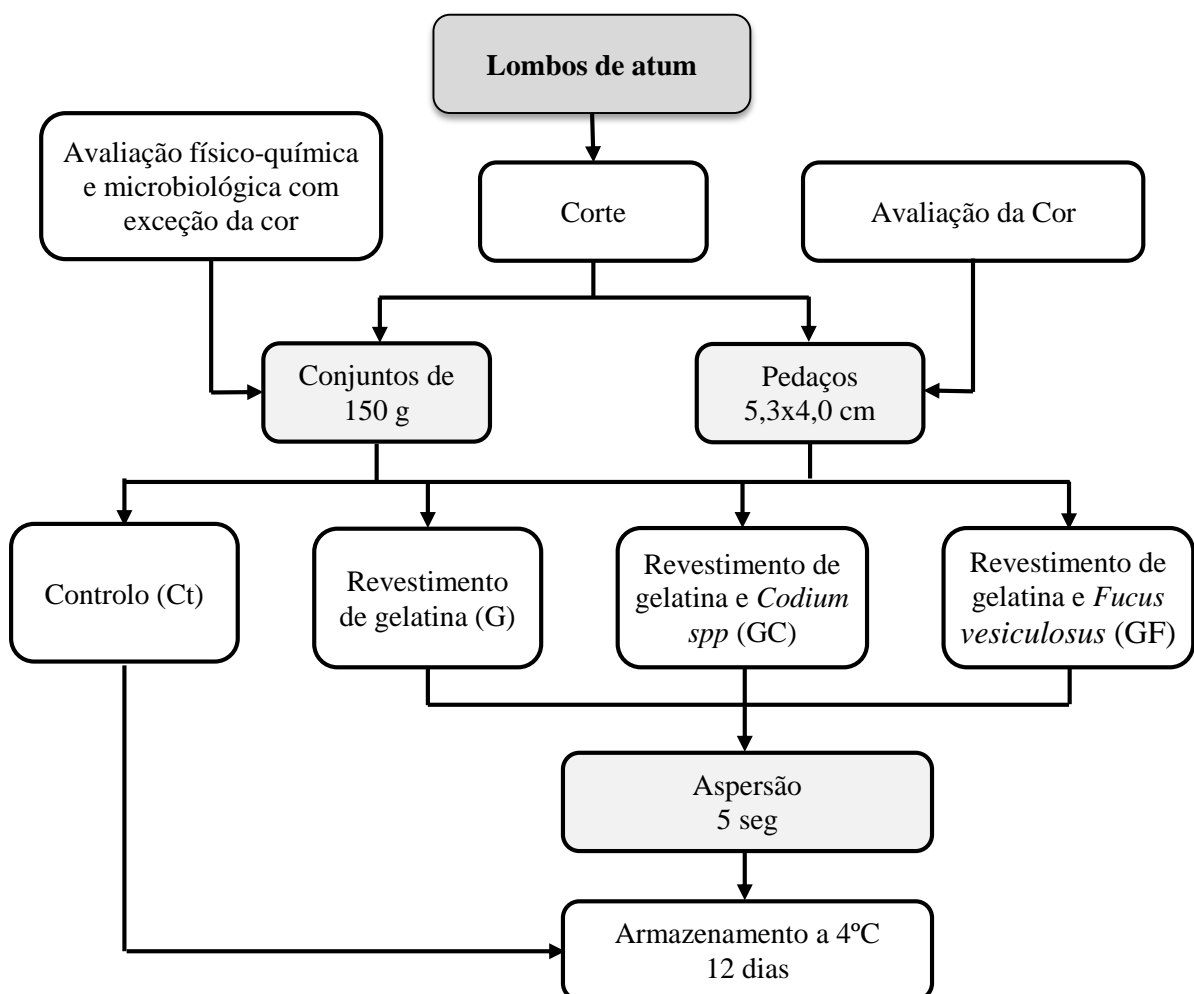
O ensaio teve a duração de 12 dias, sendo efetuadas análises de controlo analítico e microbiológico aos dias 0 ( $t_0$ ), 3 ( $t_3$ ), 6 ( $t_6$ ), 9 ( $t_9$ ) e 12 ( $t_{12}$ ). Para a avaliação dos parâmetros de cor ao longo do tempo de armazenamento foram utilizados sempre os mesmos pedaços de atum.

#### **3.5.1 Aplicação das soluções de revestimento no atum fresco**

O fluxograma do processo de aplicação dos revestimentos em atum refrigerado está representado na figura 3.

As amostras foram cortadas com 6 x 4,5 x 1cm, aproximadamente, para os diferentes dias de amostragem, em triplicado. As amostras de atum foram divididas em 4 grupos: i) controlo (Ct) sem adição de revestimento, ii) aplicação do revestimento de gelatina sem extrato de algas (G), iii) solução de revestimento de gelatina e extrato de *Codium spp* (GC) e iv) solução de revestimento de gelatina e extrato de *Fucus vesiculosus* (GF).

A aplicação dos revestimentos foi realizada segundo a metodologia descrita por Geadas (2012) com algumas modificações. A aplicação das soluções de revestimento foi feita por aspersão, com recurso a uma agulha de aspersão e compressor do equipamento laboratorial “spray dry” e uma bomba peristáltica (velocidade de 50 rpm). A aplicação do revestimento foi realizada, em ambos os lados dos lombos de atum, durante 5 segundos (seg) em cada uma das partes. Após a aplicação do revestimento, as amostras foram devidamente acondicionadas em tabuleiros e armazenadas à temperatura de refrigeração  $4\pm 1^\circ\text{C}$  (79% humidade relativa).



**Figura 3:** Fluxograma da aplicação dos revestimentos no atum fresco.

### 3.5.2 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros de avaliação seguintes foram realizados às amostras de atum preparadas no ponto 3.5.1, durante o armazenamento a  $4\pm 1^\circ\text{C}$ , aos dias 0, 3, 6, 9 e 12.

### 3.5.2.1 Teor de humidade

O teor de humidade do atum foi determinado de acordo com o método descrito na AOAC (2000). O procedimento foi realizado de acordo com o ponto 3.4.1, exceto o peso da amostra que foi de 5 g.

### 3.5.2.2 Determinação pH

O pH do atum foi determinado pelo método descrito por Wu et al (2014). As amostras foram trituradas e homogeneizadas com água destilada (1:10) e agitadas durante 5min. O pH da solução foi medido com um potenciómetro (Inolab 720, Alemanha), previamente calibrado, mergulhando o eletrodo na solução a 25°C. Foram realizadas 3 medições para cada amostra.

### 3.5.2.3 Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O índice de TBARS foi determinado pelo método descrito da Norma Portuguesa 3356:1990 por espectrofotometria.

Pesaram-se 15 g de amostra previamente triturada, adicionando-se de seguida 30 ml de uma solução composta por 7,5% de ácido tricloroacético, 0,1% de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e 0,1% de galato de propilo. Agitou-se durante 2 min para a extração do aldeído malónico. A mistura foi sujeita a filtração.

Para um tubo de ensaio, mediu-se 5 ml do extrato e adicionou-se 5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA), incubou-se num banho-maria a 100°C durante 40 min. Em simultâneo realizou-se um ensaio em branco (substituindo a amostra por TBA). Foi realizada uma curva de calibração a partir de uma solução padrão TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano) (Acros, Bélgica) com as concentrações 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 e 0.05 micromoles de aldeído malónico. Mediu-se a absorvância a 530 nm.

O índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi expresso em miligramas de aldeído malónico por 1000 g de amostra, sendo calculado pela seguinte equação:

$$(Eq. 7) \quad TBA_{mg/1000g} = \frac{72 \times c}{m \times v} (30 + mH)$$

Sendo que:

c - concentração do aldeído malónico ( $\mu\text{mol}$ ) calculada a partir da curva-padrão;

v - volume da solução da amostra (ml);

H - humidade da amostra (%);

m - massa da amostra (g)

### 3.5.2.4 Teor de azoto básico volátil total (ABVT)

O teor de ABVT das amostras foi determinado de acordo com o método de Conway descrito da Norma Portuguesa 2930:1988.

As amostras foram trituradas e homogeneizadas (Ystral x10/25, Dottingen) com 50ml da solução ácido tricloroacético a 5% durante 2 min e posteriormente filtrado o extrato para um erlenmeyer. Nas células de Conway adicionou-se na parte central da célula 1 ml de ácido bórico com indicador, na coroa circular, adicionou-se 1 ml de extrato da amostra, 0,5 ml de água destilada e 1 ml da solução de carbonato de potássio saturada. Após uma incubação de 90 min a  $40^{\circ}\text{C}$ , titulou-se com ácido clorídrico 0,02N até se observar uma coloração rosa. Para o controlo de difusão e o ensaio em branco foi substituída a quantidade de amostra por uma solução de 0,1% de sulfato de amónio e água destilada, respetivamente.

O teor de ABVT foi expresso em mg por 100 g de amostra, tendo sido calculado da seguinte forma equação:

$$(Eq. 8) \quad ABVT_{mg/100g} = \frac{21 \times (V_2 - V_0)}{(V_1 - V_0) \times V_3 \times m} (100 + H)$$

Sendo que:

$V_0$ - volume gasto de ácido clorídrico no ensaio em branco (ml);

$V_1$ - volume gasto de ácido clorídrico no controlo de difusão (ml);

$V_2$ - volume gasto de ácido clorídrico na amostra (ml);

$V_3$ - volume da amostra utilizada na determinação (ml);

m- massa da toma de ensaio (g);

H- humidade da amostra (%)

### 3.5.2.5 Avaliação da cor

A medição da cor ao atum foi realizada pelo método descrito no ponto 3.2.3.5.

A medição da cor foi realizada à superfície de cada pedaço de atum e foram realizadas 9 leituras com um ângulo de 90°, tendo sido registados os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  do sistema Cielab.

As amostras utilizadas para a determinação dos parâmetros de cor foram também fotografadas. Estas foram realizadas numa caixa com fundo preto e com orifício para colocar a máquina (Samsung H1, Korea).

### 3.5.2.6 Textura

A firmeza das amostras foi medida com um texturómetro TA.XT.Plus a partir do software *TEE32*. O teste utilizado foi realizado de acordo com Mousakhani-Ganjeh et al (2015), com algumas alterações. Foi medida a força ao longo do tempo de compressão da amostra com uma sonda de 5 mm (P/5S, 5m Sph, Stainless), a uma velocidade de 1,1 mm/s e uma profundidade de 5 mm (cerca de 50 a 60% da altura da posta). Foram efetuados 3 ensaios por amostra em diferentes locais.

Os atributos texturais avaliados foram a firmeza definida como a área total da curva de compressão (N.s) correspondente à firmeza da amostra.

## 3.5.3 Parâmetros microbiológicos

A preparação do diluente (água peptonada), e do meio de cultura, Plate count agar (PCA), foram preparados de acordo com as indicações dos fabricantes e esterilizados a 121°C durante 15 min em autoclave.

Todas as diluições decimais, bem como as inoculações foram preparadas e realizadas em ambiente estéril assegurado por um bico de bunsen (Camping Gaz). Todas as incorporações foram realizadas em triplicado.

### 3.5.3.1 Contagem de Microrganismos totais a 30°C

Para a preparação das amostras seguiu-se o método descrito pela Norma Portuguesa 2079/1989. Inicialmente, homogeneizaram-se 25 g de cada amostra em água peptonada utilizando-se um stomacher (IUL instruments, Espanha) (diluição 1:10;

suspensão mãe). Prepararam-se as diluições decimais até  $10^{-7}$  para os tempos  $t_0$ ,  $t_3$ ,  $t_6$  e  $t_9$  e o  $t_{12}$  até à diluição  $10^{-9}$  a partir da suspensão-mãe para tubos contendo água peptonada. A contagem de microrganismos totais a  $30^\circ\text{C}$  foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa 4405/2002.

Foram semeadas por incorporação 1 ml de suspensão mãe em placas de Petri estéreis e adicionada aproximadamente, 15 ml de PCA, deixando-se solidificar à temperatura ambiente. De seguida as placas foram incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 72 h.

Os resultados foram expressos em UFC/g (unidades formadoras de colónias por grama de amostra), através do cálculo do nº de microrganismos (N) por g de amostra, utilizando a seguinte equação:

$$(Eq. 9) \quad N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Em que:

$\Sigma C$  – soma das colónias contadas nas placas consideradas;

$n_1$  – número de placas consideradas na 1ª diluição;

$n_2$  – número de placas consideradas na 2ª diluição;

$d$  – fator de diluição correspondente à 1ª diluição considerada.

### 3.6 Análise estatística

O tratamento estatístico foi efetuado com recurso ao programa IBM® SPSS® Statistics versão 23 (EUA). Os dados obtidos foram avaliados através do teste de análise de variância com 1 fator (ANOVA-1 fator) seguido pelo teste de LSD para comparações múltiplas para comparações (Zar, 2010).

Para as condições indicadas nas figuras, os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão da média. O teste de Levene foi usado para testar a homogeneidade de variância para todas as variáveis. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância  $\alpha$  de 0,05 (Zar, 2010).

## 4. Resultados e Discussão

---

### 4.1 Processo de extração de gelatina e rendimento de extração

A gelatina é uma proteína fibrosa que deriva da desnaturação do colagénio por tratamento térmico (Shyni et al, 2014). O método de extração consiste em três etapas principais: pré-tratamento alcalino, tratamento ácido e extração, etapas essas que afetam as propriedades físico-químicas da gelatina (Karim e Bhat, 2009; Montero e Gómez-Guillén, 2000; Shyni et al, 20014).

O processo de extração de gelatina foi otimizado testando para isso, 7 condições de extração. A seleção das condições ótimas foi efetuada com base no rendimento obtido em cada metodologia testada. Para a otimização do processo de extração variou-se o tipo de pré-tratamento alcalino e do tratamento ácido e temperatura de extração (tabela 6).

A pepsina foi utilizada com o objetivo de solubilizar o colagénio e as suas ligações cruzadas estáveis, para aumentar o rendimento do processo de obtenção de gelatina (Nalinanon et al, 2007).

O maior rendimento no processo de extração foi 26,45%, conseguido com um pré-tratamento alcalino (0,2M NaOH,  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 2 h) e seguido do pré-tratamento ácido (0,2M ácido acético, com pepsina (15AU/g de gelatina),  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 24 h) e por fim uma extração a  $50\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Restantes resultados obtidos para as diferentes condições de extração estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7:** Rendimentos obtidos nas diferentes extrações.

Processo	Pré-tratamento	Tratamento	Rendimento de extração
A	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M 23±1°C, 12h, 2 vezes	0,41 %
B	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,2M 23±1°C, 12h, 2 vezes	0,54 %
C	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M 4±1°C, 12h, 2 vezes	7,87 %
D	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,2M 4±1°C, 12h, 2 vezes	1,53 %
E	NaOH 0,04M 27±0,5°C, 30 min	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,12M 27±0,5°C, 30 min C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,005M 27±0,5°C, 30 min	10,28 %
F	NaOH 0,1M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M + 15AU/g pepsina 4±1°C, 12h, 2 vezes	2,54 %
G	NaOH 0,2M 27±0,5°C, 1h, 2 vezes	CH <sub>3</sub> COOH 0,2M + 15AU/g pepsina 4±1°C, 24h	22,45 % 26,45 %

Paralelamente, foi também avaliado o efeito da adição de pepsina no tratamento ácido, com intuito de verificar se trazia benefício no rendimento. Os valores de rendimentos obtidos foram de 28,67±2,83% e 20,78±2,04% para o processo de extração com e sem pepsina, respectivamente. Os valores obtidos apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), apresentando o processo de extração de gelatina com pepsina maior rendimento em relação à extração sem pepsina. A adição da pepsina ao processo de extração permitiu assim obter um processo de extração mais eficiente com um aumento de cerca de 8% de rendimento em relação aos restantes processos de extração.

Haddar et al (2012), também obteve valores de rendimento no processo de extração de gelatina de peles de atum com adição de pepsina superiores, relativamente ao processo sem adição de pepsina (24,78±1,34% e 3,55±0,33%, respectivamente), sendo inferiores aos valores obtidos no presente estudo. Este aumento no rendimento do processo pela adição de pepsina pode ser explicado pela clivagem peptídeos nas regiões telopeptídeo, provocando uma maior hidrólise de gelatina. O processo e as matérias-primas

influenciam a configuração e a sequência de aminoácidos, levando a que a gelatina seja clivada em posições diferente, permitindo obtenção de rendimentos diferentes (Benjakul et al, 2009; Nalinanom et al, 2007).

Com base nos resultados obtidos o processo de extração considerado foi o processo com adição de pepsina, descrito na figura 2.

## 4.2 Caracterização da gelatina

A gelatina obtida de peles de atum neste estudo foram caracterizadas em termos de: teor de humidade, proteína, cinza, pH, cor e força de gel. Os resultados estão representados na tabela 8.

**Tabela 8:** Características físico-químicas da gelatina de pele de atum. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão.

		<b>Gelatina</b>
<b>Teor humidade (%)</b>		4,41 $\pm$ 0,15
<b>Proteína (g/100g)</b>		42,26 $\pm$ 0,57
<b>Cinzas (%)</b>		1,36 $\pm$ 0,07
<b>pH</b>		6,69 $\pm$ 0,01
<b>Cor</b>	<b>L*</b>	25,08 $\pm$ 0,52
	<b>a*</b>	1,51 $\pm$ 0,08
	<b>b*</b>	15,91 $\pm$ 0,19
<b>Força do gel (g)</b>		148,2 $\pm$ 5,00

Em termos de caracterização química, é importante a determinação do teor de humidade do teor de proteína e do teor de cinzas porque influência a qualidade da gelatina. O teor de humidade deve ser inferior a 12% para que o seu estado de equilíbrio seja mantido em condições climáticas normais. O teor de proteína representa o maior constituinte presente na gelatina, influenciando a estrutura do revestimento. O teor de cinzas corresponde à quantidade de minerais (cálcio, potássio, fósforo e sódio) presentes na gelatina, onde os valores não devem exceder 2,6%.

A gelatina de peles de atum obtida apresentou um teor de humidade (tabela 8) mais baixo quando comparado com os valores de teor de humidade obtidos num estudo desenvolvido por Haddar et al (2012) (cerca de  $5,98 \pm 0,10\%$ ). No entanto, o valor obtido está dentro do pretendido ( $<12\%$ ), pois idealmente, os valores de humidade devem ser inferiores a 12% uma vez que para valores superiores há o risco de formação de grumos e crescimento microbiológico (Schrieber e Gareis, 2007). Com processos de extração diferentes, também Shyni et al (2014) para atum gaiado (*Katsuwonus pelamis*), Alemán et al (2011) para atum (*Thunnus spp.*) e Rahman et al (2008) para atum albacora (*Thunnus albacares*) obtiveram valores superiores ( $10,9 \pm 0,24\%$ ,  $8,72 \pm 0,98$  e  $8,3 \pm 0,6\%$ , respetivamente). Esta diferença é explicada pelas diferenças no processo de extração em cada um dos estudos. Como já referido anteriormente, tal como a espécie de pescado, o processo de extração afeta as propriedades físico-químicas da gelatina obtida.

Em relação ao teor de proteína, o valor obtido foi baixo, quando comparado com outros estudos de extração de gelatina de peles de atum e outras espécies de peixe. Estudos recentes apresentam valores de recuperação de proteína superiores a 80% enquanto que no presente estudo, a percentagem de recuperação de proteína foi de 42% (Alemán et al, 2011; Haddar et al, 2012; Muyonga et al, 2004; Shyni et al, 2014; Silva et al, 2014). Estes valores inferiores podem ser explicados pelas diferenças quer no processo de extração, quer no tipo de atum (espécie, tamanho e zona de captura). O teor de proteína presente na pele de peixe representa a quantidade máxima de colagénio no tecido animal e assim o rendimento máximo de gelatina. (Muyonga et al, 2004). O teor de proteína presente na gelatina pode influenciar a estrutura molecular. Uma vez que os principais aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) responsáveis pela estabilidade da estrutura estão em menores quantidade, pode levar a uma força de gel inferior e a um revestimento com menos propriedades funcionais (barreira aos gases e permeabilidade) (Haddar et al, 2012; Segtnan et al, 2003; Schrieber e Gareis, 2007)

A quantidade de cinza obtida na gelatina de peles de atum (tabela 8) foi baixa quando comparado com resultados obtidos para gelatina de peles de atum por Haddar et al (2012) ( $3,51 \pm 0,68\%$ ) e superiores quando comparados com Shyni et al (2014) ( $0,68 \pm 0,06\%$ ). O teor de cinza (que está diretamente relacionado com o teor de cálcio) tem especial importância em algumas aplicações na área alimentar. Nesta área gelatinas com teor de cinzas superiores a 2% são normalmente utilizadas (Cho et al, 2004; Muyonga et al, 2004). No entanto, segundo alguns autores o teor de cinzas máximo recomendado para gelatina é de 2,6% pelo que a gelatina produzida no presente estudo se

encontra dentro dos valores recomendados (Alfaro, 2008; Haddar et al, 2012; Muyonga et al, 2004). Para este estudo o teor de cinzas não é fator limitante, este parâmetro foi quantificado por vários autores por ser considerado uma especificação da qualidade da gelatina (Alfaro et al, 2008; GME, 2015; Ktari et al, 2014).

O valor de pH determinado (tabela 8) no presente estudo é mais baixo do que os valores apresentados por Haddar et al (2012), pH 7,2, e mais elevado do que os valores relatados por Shyni et al (2014) que obtiveram valores de pH de 4,29, ambos para gelatinas de peles de atum. Haddar et al (2012) realizaram uma desmineralização após o processo de extração, que explica a diferença obtida. Por outro lado, Shyni et al (2014) não utilizaram pepsina e a etapa da extração e evaporação foi realizada a uma temperatura inferior, 45°C e 5°C respectivamente. A adição de pepsina no processo de extração influencia o pH final da gelatina extraída uma vez que a inativação da pepsina se realiza com o ajuste do pH para 7,0. Os valores de pH têm uma influencia decisiva nas propriedades biofísicas da gelatina, nomeadamente na solubilidade, gelificação, viscosidade e capacidade de ligação à água (Rattaya et al, 2009). O pH da gelatina deve apresentar pH ácido, sendo obtido neste estudo, porque este influencia a viscosidade. A viscosidade também influencia a força do gel, valores altos permitem maior estabilidade dos revestimentos (Schrieber e Gareis, 2007).

De referir, que, e uma vez que, os pré-tratamentos no processo de extração têm como objetivo principal a remoção das gorduras e outros compostos não proteicos, o teor de gordura não foi quantificado, uma vez que na literatura os valores de gordura em gelatina de peixe são residuais (inferior a 1%) (Haddar et al, 2012; Alfaro et al, 2014; Shyni et al, 2014;) e segundo a associação Gelatine Manufacturers of Europe (GME) a gelatina é livre de gordura. Os pré-tratamentos no processo de extração têm como objetivo principal a remoção das gorduras e outros compostos não proteicos.

Por fim, foi avaliada a cor da gelatina, que foi representada pelos parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ),  $a^*$  (verde-vermelho) e  $b^*$  (azul-amarelo), estando estes valores apresentados na tabela 8. Dependendo da origem da matéria-prima e o tipo de extração realizada, a cor da gelatina poderá variar (Skyni et al, 2014; Silva et al, 2014). No entanto, a cor da gelatina não influencia as propriedades funcionais da mesma. Um estudo realizado por Kaewdang e Benjakul (2015) a gelatina obtida da barbata natatória de atum apresenta uma coloração menos amarela e vermelha do que a gelatina obtida no presente estudo. No entanto, a cor não afeta as propriedades funcionais da gelatina (Benjakul et al,

2009; Lassoued et al, 2014). Mas gelatinas com cor pálidas são mais desejáveis, uma vez que a cor poderá influenciar a cor do alimento (Schrieber e Gareis, 2007).

A força do gel (FG) ou “bloom” da gelatina é a principal propriedade física que determina a sua qualidade. Os resultados para a força do gel da gelatina estão representados na tabela 8. Quando comparado com o valor obtido (FG= 189 g) no estudo de Haddar et al (2012), verifica-se que o valor obtido no presente estudo é inferior, apesar de ambos os estudos apresentarem procedimentos de extração idênticos com exceção da desmineralização que não foi realizada neste estudo. Também outros autores, que utilizaram diferentes processos extração de gelatina de peles de atum, obtiveram valores superiores: Gómez-Estaca et al (2009a) obteve uma FG de 167 g, Shyni e colaboradores (2014) obteve 177 g e Cho et al (2005) obteve 426g. As diferentes metodologias no processo de extração, explicam as diferenças no valor de FG obtidas. A força de gel é afetada pelo processo de extração, matéria-prima, concentração da solução de gelatina, tempo e temperatura de maturação do gel e pH (Alfaro et al, 2014; Silva et al, 2011). Quanto maior for a força do gel maior será a estabilidade da gelatina, proporcionando melhores revestimentos (Schrieber e Gareis, 2007). A qualidade da gelatina pode ser avaliada de acordo com os valores de força de gel, existindo três categorias de qualidade: baixa (FG <150), a média (FG entre 150 e 220) e a alta (FG 220 a 300) (Lassoued et al, 2014), pelo que a gelatina obtida no presente estudo poderá ser considerada de baixa qualidade. Geralmente, as gelatinas de peixe têm valores inferiores de força de gel quando comparado com gelatinas extraídas de mamíferos (Cho et al, 2005). Karim e Bhat (2009) referem que a gelatina de peixe tem uma força de gel entre 0 a 270 g e que a gelatina de origem bovina ou de porco varia entre 200 e 240 g.

As características da gelatina de peles de atum obtidas no presente estudo, podem ainda ter sido influenciadas pela tipo e tempo de armazenamento que a matéria-prima foi exposta, estiveram 6 meses a  $-12,94 \pm 1,25^{\circ}\text{C}$ . Segundo alguns estudos feitos com extração de gelatina a partir de peles frescas e congeladas foi possível observar que a força do gel é maior em gelatinas extraídas de peles frescas (Fernández-Díaz et al, 2003; Liu et al, 2008). Fernández-Díaz et al (2003) compararam as propriedades moleculares e reológicas de gelatina de pele solha sujeitas ao congelamento a  $-12^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 15 dias, e ficou demonstrado que o congelamento das peles de peixe afeta negativamente a composição molecular havendo uma desnaturação das proteínas, diminuição da extração  $\beta$  e  $\gamma$  componente (dímeros e trímeros da  $\alpha$ -cadeia), e as propriedades reológicas da gelatina também diminuiu, esse efeito é mais notável quando armazenadas a  $-12^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3 Caracterização das soluções de revestimento à base de gelatina de peixe com adição de extratos de macroalgas

As soluções utilizadas como revestimentos neste estudo (tabela 6) foram caracterizadas em termos de quantificação total de polifenóis, redução do radical DPPH, cor e pH. Os resultados desta caracterização encontram-se na tabela 9.

Estes parâmetros foram avaliados para compreender se as condições iniciais das soluções de revestimento poderiam influenciar o efeito da preservação do atum fresco.

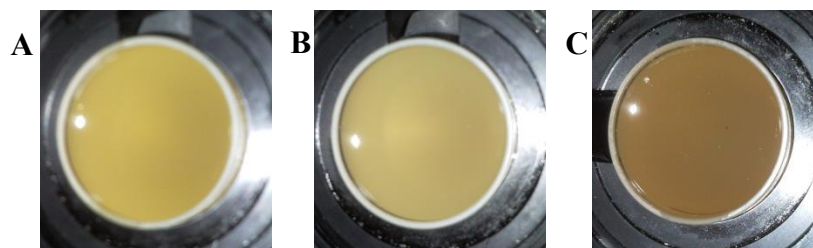
**Tabela 9:** Resultados da caracterização das soluções de revestimento. Gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium* spp (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em relação ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \* G; # GC.

		G	GC	GF
<b>pH</b>		6,74 $\pm$ 0,01	6,64 $\pm$ 0,01*	6,55 $\pm$ 0,01*#
<b>Cor</b>	<b>L*</b>	27,88 $\pm$ 0,14	24,16 $\pm$ 0,15*	16,81 $\pm$ 0,21*#
	<b>a*</b>	-0,28 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03*	0,35 $\pm$ 0,05*#
	<b>b*</b>	16,54 $\pm$ 0,13	16,30 $\pm$ 0,25	6,58 $\pm$ 0,25*#
<b>Polifenóis (mg EAG/ml)</b>		0,031 $\pm$ 0,008	0,031 $\pm$ 0,008	0,079 $\pm$ 0,015*#
<b>DPPH (%)</b>		1,37 $\pm$ 0,82	1,51 $\pm$ 0,45	2,56 $\pm$ 0,70

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que a adição de extrato de macroalgas leva à diminuição dos valores de pH das soluções de revestimento ( $p < 0,05$ ) (tabela 7). Também Augusto (2013) obteve valores de pH mais baixos para soluções de revestimento com adição de extrato de *Fucus spiralis*, e *Codium tomentosum* (6,13 $\pm$ 0,01, 6,72 $\pm$ 0,02, respetivamente). Não existe um pH ideal para os revestimentos, sendo sempre influenciado pela sua composição. Estes revestimentos em contato com alimento podem provocar à superfície uma alteração de pH.

A determinação da cor das soluções de revestimento demonstra haver diferenças entre as soluções ( $p < 0,05$ ), sendo que a solução GF demonstra maior diferenças dos parâmetros L\*, a\* e b\*, cor mais escura, vermelhada e menos amarelada, quando

comparada com G. A diferença de cor ( $\Delta E$ ) das soluções de revestimento com extrato de macroalgas quando comparada com a solução de gelatina (G) demonstra haver diferenças de  $3,75 \pm 0,42$  e  $14,90 \pm 0,31$  para GC e GF, respectivamente. A figura 4 mostra as cores visuais das soluções de revestimento.



**Figura 4:** Fotografias das soluções de revestimentos. A- Gelatina; B- Gelatina com extrato de *Codium spp*; C- Gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus*.

Pelas fotografias é possível verificar as diferenças de cor que existem entre as soluções, estas apresentam uma cor opaca. No entanto, é provável que as soluções de revestimento não alteraram a cor do atum, devido á método de adição que consiste em aspergir uma pequena quantidade de revestimento sobre os lombos de atum. Podendo ser comprovado no ponto 4.4.5.

A avaliação da capacidade antioxidante das soluções de revestimento é um ponto importante para o presente estudo, uma vez que um dos maiores problemas para a indústria é a oxidação do atum fresco, sendo necessário o desenvolvimento e/ou descoberta de novas técnicas que permitam a conservação a longo prazo do peixe fresco. Com a adição dos extratos de macroalgas pretende-se atribuir propriedades antioxidantes aos revestimentos. Em relação à quantificação dos polifenóis totais verificou-se um destaque para o revestimento com extrato de *Fucus vesiculosus*, com valor superior aos outros revestimentos ( $p < 0,05$ ).

Como entre as soluções de revestimento G e GC não existiram diferenças estatisticamente significativas, realizou-se a quantificação de polifenóis separadamente à gelatina de pele de atum e aos extratos de *Codium spp* e *Fucus vesiculosus*. A gelatina apresentou maior valor do que o extrato de *Codium spp*,  $0,042 \pm 0,006$  e  $0,024 \pm 0,009$  mg EAG/ml, respectivamente. Assim conclui-se que o extrato de *Codium spp* não contribui para o aumento da capacidade antioxidante dos revestimentos estudados. O extrato de *Fucus vesiculosus* apresentou uma quantificação de polifenóis de  $0,408 \pm 0,056$  mg EAG/ml.

No entanto, estes resultados não devem ser considerados isoladamente, pois a gelatina e o glicerol presente nos revestimentos podem interferir nos resultados obtidos.

De acordo com Blanco-Pascual et al (2014) e Kadam et al (2015), certos aminoácidos aromáticos e açúcares podem contribuir para o aumento do conteúdo fenólico, devido à capacidade destas substâncias de reagir com o reagente Folin-Ciocalteu. Assim, torna-se de extrema importância a avaliação da capacidade de redução de DPPH.

Os resultados obtidos mostram que na capacidade de redução de DPPH não existiram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre as soluções de revestimento (tabela 7). No entanto existe uma tendência dos revestimentos com extrato de algas terem maior percentagem de redução do radical DPPH, principalmente o revestimento de gelatina com incorporação de extrato *Fucus vesiculosus*. Esta tendência pode ser também verificada com a determinação da percentagem de redução DPPH na gelatina e dos extratos de macroalgas, separadamente. A gelatina obteve um valor para a capacidade de redução do DPPH de  $11,93 \pm 1,66\%$ , o extrato de *Codium spp* de  $11,37 \pm 1,67\%$  e extrato de *Fucus vesiculosus* de  $41,17 \pm 1,51\%$ . Os valores da gelatina são devido à composição de aminoácidos, glicina e prolina, que atribui capacidade antioxidante e capacidade de redução do radical.

## **4.4 Efeito dos revestimentos produzidos no tempo de prateleira de atum refrigerado**

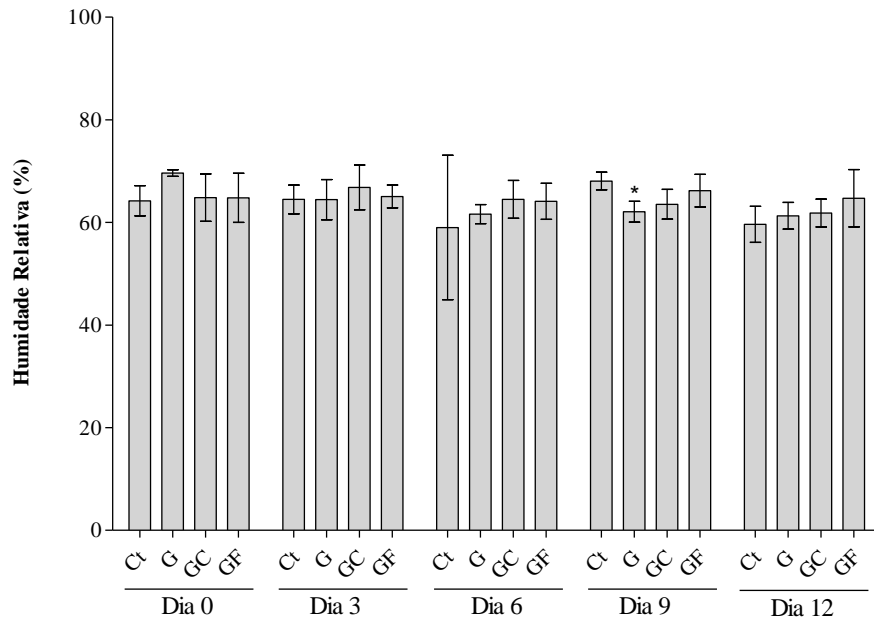
### **4.4.1 Parâmetros físico-químicos**

As soluções de revestimentos desenvolvidas no ponto 3.4.1 foram aplicadas em lombos de atum fresco (tabela 6).

Efetuarão-se análises físico-químicas, ao atum armazenado à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  ao longo de 12 dias, a diversos parâmetros, nomeadamente à cor, ABVT, pH, teor de humidade e textura nas amostras de atum controlo e revestidas com as soluções G, GC, GF (aos dias 0, 3, 6, 9 e 12 de amostragem).

#### **4.4.1.1 Teor de Humidade**

Os resultados do teor de humidade do atum com e sem revestimento ao longo do tempo de armazenamento encontram-se representados na figura 5 e no anexo 1.



**Figura 5:** Teor de humidade ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas cada dia de análise ( $p<0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*controlo.

A perda de humidade no músculo de peixe ocorre devido à libertação de exsudado. Os resultados obtidos na figura 5 mostram não haver durante o armazenamento diferenças significativas entre o controlo e as amostras tratadas em cada tempo ( $p>0,05$ ), com exceção do tempo 9 entre o controlo e o tratamento com gelatina (G) onde ocorreu uma diminuição aproximadamente 6%.

Ao longo do tempo de armazenamento foi possível observar que apenas as amostras revestidas com gelatina (G) apresentaram diferenças de humidade ( $p<0,05$ ) (Anexo 1). Esta diferença pode ser justificada com a diferença obtida para o valor inicial (superior 5%), devido à possível heterogeneidade das amostras, quando comparando com os valores iniciais obtidos para as amostras submetidas aos outros revestimentos. Os restantes tratamentos não apresentaram variações no teor de humidade ao longo do tempo de armazenamento.

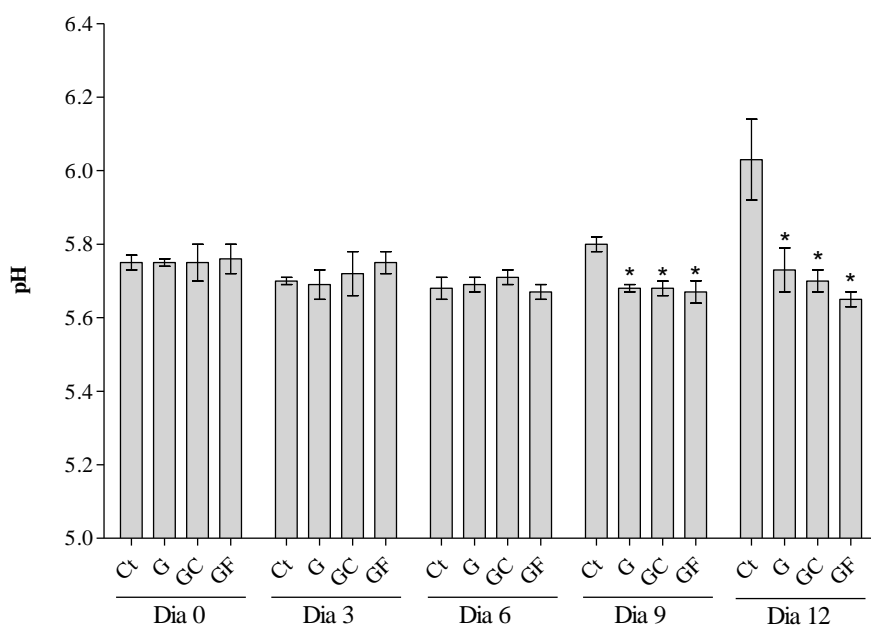
Um dos problemas derivado da perda de água, é a perda de suculência do atum. Assim, o objetivo é que o valor do teor de humidade permaneça constante durante o tempo de armazenamento. Neste estudo, e como referido anteriormente, o teor de humidade mantém-se constante ao longo tempo independentemente do revestimento considerado,

contribuído para a manutenção da qualidade dos lombos de atum durante os 12 dias de armazenamento, nomeadamente ao nível da suculência.

Khodabux et al (2007), analisaram os teores de humidade de atum fresco, obtendo valores para atum gaiado (*Katsuwonus pelamis*) e atum albacora (*Thunnus albacares*) entre 66,5-72,3% e 70,3-72,7%, respetivamente. Estes valores estão próximos dos valores obtidos após 12 dias de armazenamento em condições de refrigeração.

#### 4.4.2 Determinação do pH

Os resultados do pH do atum com e sem revestimento ao longo do tempo de armazenamento encontram-se representados na figura 6 e anexo 2.



**Figura 6:** pH ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*controlo.

A degradação do atum influencia o aumento do valor de pH, devido às reações de degradações químicas de aminoácidos e microbiológicas, pela produção de amónia e TMA.

Analisando a figura 6, verifica-se que o valor de pH ao tempo 0, 3 e 6 dias não apresentar diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Relativamente aos tempos 9 e 12, o controlo apresentar um aumento

significativo nos valores de pH em relação às amostras com os vários tratamentos. O aumento que ocorre do valor de pH aos tempos 9 e 12 nas amostras Ct pode ser explicado devido às reações químicas e microbiológica de degradação do atum. No entanto, este aumento não foi observado nas amostras com revestimento, sugerindo assim que os revestimentos podem criar uma barreira ao oxigênio, tornando a aplicação destes de interesse quando o objetivo é o aumento do tempo de prateleira do atum fresco (Volpe et al, 2015). Estes valores estão também em concordância com o trabalho de Andrade (2006), no estudo sobre variação do valor de pH no atum fresco ao longo do tempo de armazenamento.

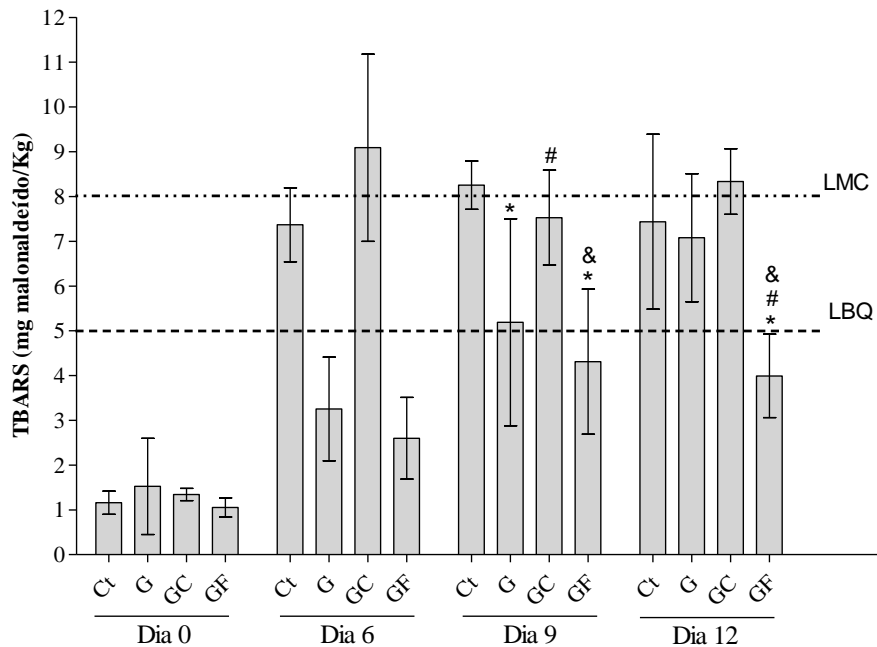
Por outro lado, as amostras Ct, G e GC ao longo do tempo não apresentaram variações de pH ( $p < 0,05$ ), enquanto que as amostras com revestimento GF apresentaram valores estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) nos dias 6, 9 e 12 quando comparados com os dias 0 e 3 (anexo 2). Assim, a diminuição do pH que ocorre no dia 6 na amostra GF pode advir do revestimento aplicado, que levou à produção de substâncias ácidas, como ácido láctico.

Um estudo com gelatina de Gudunho (*Aluterus monoceros*) e óleos de erva príncipe (*Cymbopogon citratos*) observou-se os mesmos resultados para o pH, quando aplicada em perca (*Lates calcarifer*) armazenada a 4°C durante 12 dias. O aumento do pH das amostras de peixe durante o armazenamento foi associado à acumulação de compostos alcalinos como a amônia e TMA, gerados a partir de ações enzimáticas microbianas (Ahmad et al, 2012).

Também os estudos realizados por Feng et al (2016) e Wu et al (2014) vão ao encontro dos resultados obtidos neste estudo, onde obtiveram valores superiores para o pH da amostra do controlo, relativamente às amostras revestidas com soluções de quitosano/gelatina de peixe, armazenadas a 4°C. As amostras revestidas proporcionaram uma inibição da degradação por microrganismos, levando a uma menor produção de bases orgânicas, sendo o pH mais estáveis do que o grupo controlo.

#### 4.4.3 Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Na figura 7 e anexo 3 estão representados os resultados do TBARS das amostras de atum revestidas com 5% de gelatina, 5% de gelatina com 1% extrato de *Codium spp.* e 5% gelatina com 1% de *Fucus vesiculosus*, ao longo do tempo de armazenamento.



**Figura 7:** Os TBARS ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp.* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). LBQ – Limite de boa qualidade (Santos, 2008), LMC – Limite máximo de consumo (Santos, 2008). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*controle; # G; & GC.

Os TBARS indicam a formação de produtos de oxidação lipídica secundária, no qual os peróxidos são oxidados em aldeídos e cetonas (Ozogul et al, 2010).

O valor recomendado de TBARS que indica a boa qualidade do peixe (congelados, refrigerados ou armazenados com gelo) é de 5 mg de malonaldeído/ kg de produto, sendo admissíveis os valores até 8 mg malonaldeído/ kg de produto (Sallam, 2007, Santos, 2008)

Como pode ser observado pela figura 7, as amostras de atum com e sem aplicação de revestimentos não mostraram diferenças significativas aos dias 0 e 6 ( $p > 0,05$ ). No dia 9 as amostras Ct e GC apresentavam valores superiores em relação às amostras G e GF ( $p < 0,05$ ). Já no tempo 12 a amostra GF apresentava um valor inferior em relação aos

restantes tratamentos ( $p < 0,05$ ), situando-se este último a baixo do LBQ. As amostras revestidas com GF apresentaram durante ao longo tempo de armazenamento valores inferiores ao limite máximo recomendado do limite de boa qualidade. Além disso, os valores obtidos foram tendencialmente inferiores quando comparados com as restantes amostras. Estes resultados demonstram que a utilização de *Fucus vesiculosus* ajuda a inibir oxidação da lipídica do atum, pela presença de composto com atividade antioxidante presente no extrato da alga (tabela 9). No entanto, em todas as amostras ao longo do tempo existe um aumento do valor dos TBARS (anexo 3). Este aumento durante o armazenamento pode ser atribuído à desidratação parcial do peixe e aumento da oxidação dos ácidos gordos insaturados (Nowzari et al, 2013). De referir que os TBARS estão relacionados com a alteração da cor e da textura do atum, ao longo do tempo de armazenamento, justificando as alterações destes parâmetros observadas (será discutido no ponto 4.4.5 e 4.4.6).

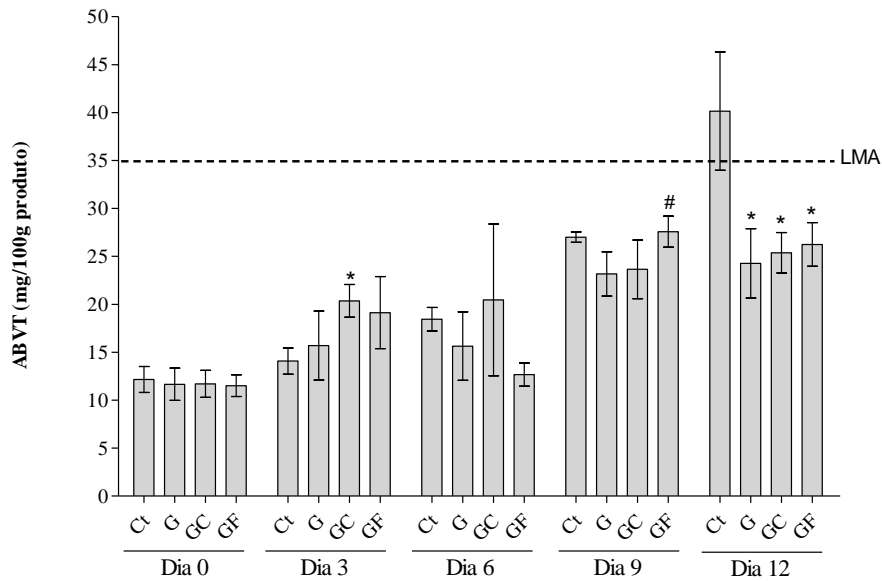
Nowzari et al (2013) relatou também um aumento dos valores TBARS, sendo maiores para as amostras controlo do que para as amostras com 1% quitosano e 3% de gelatina de peixe em filetes de truta, armazenadas a 4°C durante 16 dias, indo de acordo com os resultados do presente estudo.

#### **4.4.4 Teor de azoto básico volátil total (ABVT)**

Nos alimentos em geral, o azoto encontra-se principalmente na forma de proteínas, as quais por ação das enzimas do próprio alimento ou de microrganismos, são hidrolisadas, originando compostos sucessivamente mais simples: proteínas--polipéptidos--péptidos--aminoácidos.

Na decomposição anaeróbica das proteínas e de compostos resultantes da sua hidrólise, os produtos finais podem ser completamente oxidados, dando origem a compostos com aromas desagradáveis- sulfureto de hidrogénio, mercaptanos, amónia, aminas, entre outros. É o conjunto do amoníaco e das aminas voláteis que é doseado na determinação do ABVT, sendo este considerado como um índice de frescura do pescado e de outros alimentos.

Os resultados obtidos para o teor de azoto básico volátil total (ABVT) das amostras revestidas ao longo do tempo armazenamento, podem ser observados na figura 8 e anexo 4.



**Figura 8:** O ABVT ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). LMA – Limite máximo admissível (Reg. nº1022/2008). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*Ct; # G.

Na legislação portuguesa não está definido qual o limite máximo para a presença de ABVT em atum fresco, pelo que, no presente estudo o limite máximo admissível (LMA) de ABVT considerado foi de 35 mg/ 100 g de produto segundo o Regulamento (CE) nº 1022/2008. Outros autores têm considerado como limite máximo o valor de 30 mg/ 100 g de produto (Ruiz-Capillas e Moral, 2005; Andrade, 2006). No entanto, não existe base científica para definir esse valor.

De acordo com a figura 8, o valor do ABVT não existem diferenças nos valores de ABVT entre as diferentes amostras aos dias 0 e 6 ( $p > 0,05$ ). No dia 3, apenas o tratamento com gelatina e extrato de *Codium spp* apresentou valores superiores em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). No dia 9 de armazenamento, apenas as amostras revestidas G e GF apresentaram diferenças entre si ( $p < 0,05$ ), esta última com o valor de ABVT superior.

Ao dia 12, o Ct apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação às restantes amostras com revestimento, passando mesmo o limite máximo admissível de 35 mg/ 100 g produto. O aumento do ABVT pode ser atribuído à atividade microbiológica resultando na acumulação de bases voláteis, conferindo sabores desagradáveis ao peixe. Assim, este aumento já era de esperar, uma vez que era de prever uma degradação das

amostras Ct mais acentuada, relativamente às amostras com revestimento, porque a gelatina e o glicerol têm propriedade de permeabilidade ao oxigênio (reduzindo a decomposição anaeróbia das proteínas) e os extratos de alga capacidades antimicrobiana (reduzindo a hidrólise das proteínas) (Bonilla et al, 2012; Chew et al, 2008; Díaz-Rubio et al, 2008).

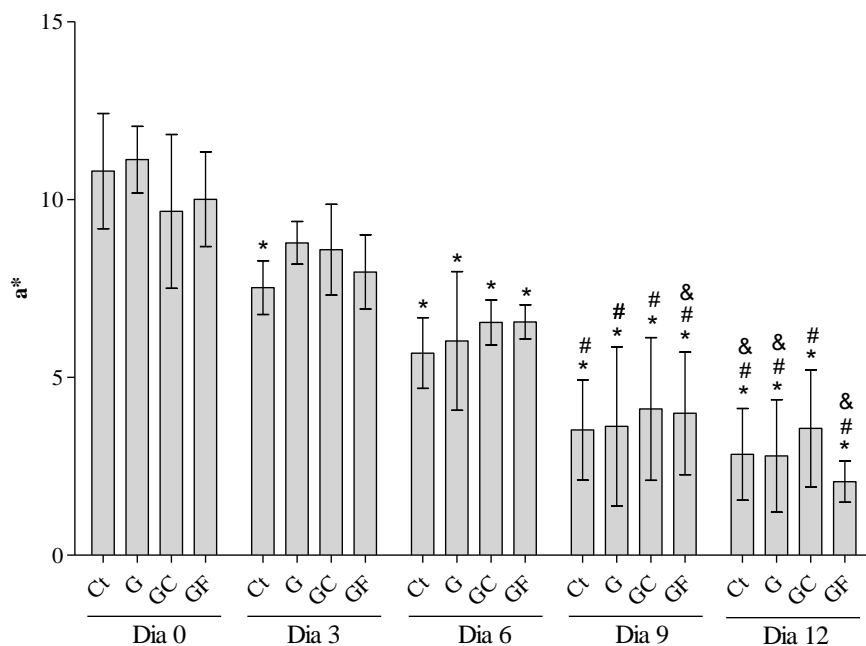
Relativamente à evolução dos teores de ABVT ao longo do tempo de armazenamento das amostras dos vários tratamentos estão representados no anexo 4. Em relação às amostras Ct e G verificaram-se um aumento significativo dos valores de ABVT ( $p < 0,05$ ) aos dias 9 e 12 quando comparadas com o dia 0, 3 e 6 e somente no Ct do dia 9 para o dia 12. As amostras GC só obtiveram aumentos quando comparado o dia 0 com os restantes dias. Por fim, as amostras GF apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) para todos os dias, com exceção do dia 0 quando comparado com dia 6 e o tempo 9 com o dia 12. As amostras com revestimento ao longo do tempo armazenamento previnem as reações que desencadeiam o aumento do ABVT, tais como a degradação microbiológicas, que leva à formação de substâncias azotadas, amónia e TMA, e levando também ao aumento do pH que se verificou também no presente estudo (figura 6).

Um estudo realizado por Andrade (2006) a atum (*Thunnus Atlanticus*) armazenado a 4°C durante 19 dias, apresentou valores de ABVT iniciais entre 14,59 e 14,78 mg de azoto/ 100 g, estando ligeiramente acima dos valores que foram obtidos neste estudo, e valores ao dia 12 entre 20,32 e 22,58 mg de azoto/ 100 g, valores ligeiramente abaixo dos que foram obtidos para as amostras com revestimento, G, GC e GF.

Também Nowzari e colaboradores (2013), utilizaram soluções de revestimento à base de gelatina de pele de peixe com adição de quitosano em filetes de truta (*Oncorhynchus mykiss*) armazenados a 4°C durante 16 dias. O valor inicial de ABVT obtido pelos autores variou entre 14,93 e 18,78 mg/ 100 g e as amostras sofreram um aumento gradual ao longo tempo, ficando abaixo do valor 23 mg/ 100 g ao fim dos 12 dias de armazenamento.

#### 4.4.5 Avaliação de Cor

Na figura 9 e anexos 5, 6, 7, 8 e 9 estão representados os resultados obtidos para os parâmetros de cor L\*, a\* e b\*, para as amostras de atum armazenados durante 12 dias.



**Figura 9:** Parâmetro a\* ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*Dia 0; # Dia 3; & Dia 6

A cor dos produtos alimentares é um atributo avaliado pelo consumidor no momento da compra, sendo importante essa avaliação e determinação (Mousakhani-Ganjeh et al, 2015). No caso do atum fresco, os consumidores preferem uma tonalidade vermelha no momento da compra.

Na figura 9, o parâmetro a\* (verde-vermelho) apresentou um decréscimo significativos do valor entre os tempos de armazenamento 0 e 12 e dia 3 para o dia 9 e 12 para todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ). As amostras controle apresentaram também uma diminuição nos valores de a\* ao dia 3 quando comparado com o dia 0 ( $p < 0,05$ ). Também foi observado uma descida do valor no tempo 3 e no tempo 9 e 12 da amostra GF e no tempo 12 das amostras Ct e G.

A diminuição dos valores do parâmetro  $a^*$  observados significa a perda da tonalidade vermelha dos lombos de atum ao longo do tempo de armazenamento, fenómeno este que está relacionado com a oxidação da mioglobina, que na presença de oxigénio provoca a conversão da oximioglobina (cor vermelha brilhante) a metamioglobina (cor castanha) e à oxidação lipídica provocando alteração de cor (Wongwichian et al, 2015)







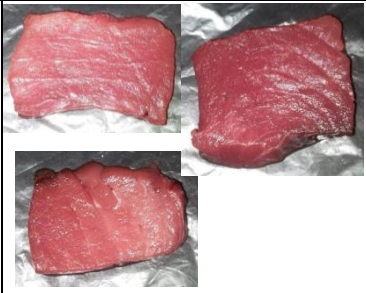



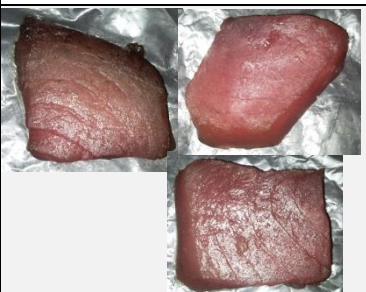

Assim, pode verificar-se que as soluções de revestimentos desenvolvidas permitem que a cor vermelha lombos de atum permaneça por mais tempo devido às propriedades de permeabilidade ao oxigénio e à capacidade antioxidante.

Relativamente aos parâmetros luminosidade ( $L^*$ ) e variação de cor entre o azul-amarelo ( $b^*$ ) não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) ao longo do tempo de armazenamento, quando comparado por cada tratamento (anexo 5 e 7) e por cada dia de análise (anexo 6 e 8). Os valores de  $L^*$  e  $b^*$  das amostras mantiveram-se constantes ao longo do tempo.

No parâmetro  $a^*$  (variação de cor entre o verde e o vermelho) não apresentou diferenças estatísticas em cada dia de análise ( $p>0,05$ ) (anexo 7), não havendo grandes diferenças da cor vermelha das amostras com o mesmo tempo.

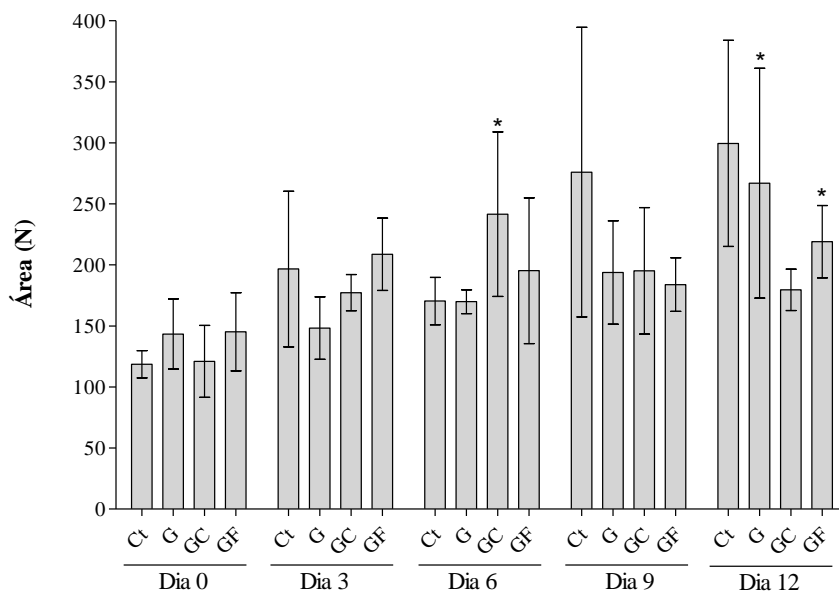
As alterações de cor também são possíveis de observar através das fotografias das amostras de atum confirmando os resultados obtidos com o colorímetro, sendo o parâmetro  $a^*$  é mais perceptível na perda da cor vermelha. As fotografias dos lombos de atum do tempo 0, 6 e 12 estão representadas na tabela 8, sendo que as fotografias dos tempos todos de armazenamento encontram-se no anexo 10. As amostras revestidas com gelatina e extrato de algas (*Codium spp* e *Fucus vesiculosus*) apresentaram a tonalidade vermelha até ao dia 9, o que poderá indicar melhor qualidade visual para os consumidores (anexo 10) do armazenamento.

**Tabela 10:** Amostras de atum ao longo do armazenamento, ao tempo 0, 6 e 12. Controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium* spp (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF).

	Dia 0	Dia 6	Dia 12
Ct			
G			
GC			
GF			

#### 4.4.6 Avaliação da textura

Os resultados da textura dos filetes de atum estão representados através do parâmetro firmeza (figura 10 e anexo 11) ao longo dos 12 dias de armazenamento à temperatura de refrigeração.



**Figura 10:** A firmeza ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*Dia 0.

A determinação da textura no presente estudo foi avaliada através de curvas de penetração obtidas pelo software. Foi posteriormente calculada a área que corresponde ao valor da força (N) exercida pela sonda quando a penetração no lombo de atum. Os valores obtidos refletem assim os valores de firmeza dos lombos, maiores valores indicam maior resistência à penetração da sonda e logo uma maior consistência dos tecidos (Mousakhani-Ganjeh et al, 2015).

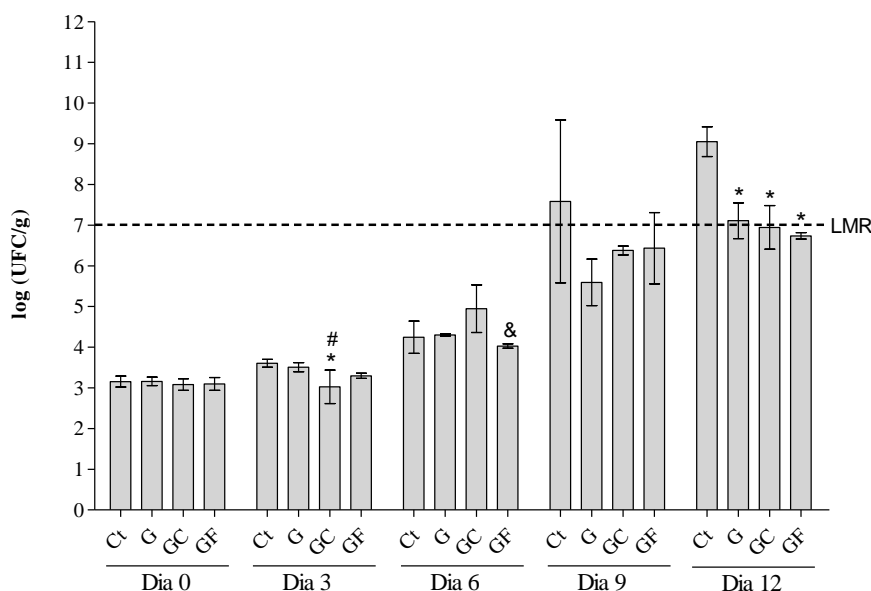
Durante o tempo de armazenamento, observaram-se algumas alterações nos valores de firmeza das amostras avaliadas, nomeadamente o aumento, principalmente nas amostras revestidas com GC entre os dias 0 e 6 e para as amostras revestidas com G e GF entre os dias 0 e 12 de armazenamento (figura 10). A alteração da firmeza no atum pode estar relacionada com as alterações das proteínas do músculo (desnaturação proteica que ocorre durante o armazenamento), uma vez que a perda de solubilidade da proteína faz aumentar a rigidez do músculo, devido à alteração na configuração da proteína (Sikorski,

1978). E ainda a textura pode tornar-se mais rígida para peixes com teores de lípidos inferiores a 6% (Sikorski e Kolakowska, 2002).

No entanto, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos utilizados em cada dia de análise ( $p < 0,05$ ) (Anexo 11). Mantendo idênticos os valores de textura das amostras (Ct, G, GC, GF) quando comparadas no mesmo dia.

#### 4.4.7 Microrganismos mesófilos totais a 30°C

Os resultados dos microrganismos mesófilos totais a 30°C ou contagem de viáveis totais (TVC), nas amostras durante o armazenamento estão representados na figura 11 e anexo 12.



**Figura 11:** A contagem dos microrganismos mesófilos a 30°C ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). LMR- Limite máximo recomendável. Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \*Ct; # G; & GC.

O limite máximo recomendável para peixes crus para a contagem de microrganismos mesófilos totais é de 7 log (UFC/g) (Nowzari et al, 2013; Andrade, 2006, Sallam, 2007).

No início do estudo (dia 0) não foram encontradas diferenças entre as amostras, o que poderá indicar a qualidade do pescado no início. No terceiro dia de armazenamento

o revestimento formulado GC foi o que apresentou uma menor carga microbiana em relação às amostras Ct e G ( $p < 0,05$ ). Ao dia 6 de armazenamento, as amostras revestidas com GF foram as que apresentaram menores valores de microrganismos mesófilos totais em relação às amostras revestidas com G e GC e ao controlo ( $p < 0,05$ ).

A partir dia 9 de armazenamento as amostras controlo apresentaram valores de microrganismos totais acima do limite máximo recomendável. As amostras revestidas com G apenas ao dia 12 de armazenamento apresentaram um valor acima do limite. As restantes amostras, GC e GF, encontravam-se abaixo do limite de microrganismos mesófilos totais.

Ao observar a evolução da carga microbiana ao longo do tempo de armazenamento (anexo 12), apenas as amostras revestidas com GC apresentaram alterações, as outras amostras Ct, G GF não apresentaram homogeneidade de variância.

Na amostra GC foi possível observar diferenças estatísticas entre todos os dias ( $p < 0,05$ ), com exceção do dia 0 com o dia 3 e dia 9 com o dia 12.

A introdução dos extratos das algas *Codium spp.* e *Fucus vesiculosus* na gelatina, permite aparentemente manter a qualidade microbiológica do pescado durante o tempo de armazenamento. Isto poderá dever-se ao facto dos extratos de algas conterem compostos ativos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes que desequilibram as membranas celulares e retardam o crescimento microbiano.

Nowzari et al (2013) e Feng et al (2016), observaram que a aplicação de um revestimento formulado por quitosano e gelatina em filetes de peixe permitiu a manutenção da qualidade microbiológica do pescado até ao final do ensaio (19 e 17 dias, respetivamente). O mesmo foi observado no presente estudo, onde as amostras revestidas com gelatina e extrato das algas apresentam uma menor carga microbiana até ao final do ensaio. Este resultado também poderá ser explicado pelas características presentes nos revestimentos, de permeabilidade ao oxigénio (gelatina) e de antimicrobiano (extrato de algas), retardando o crescimento microbiano.

Por outro lado, o crescimento dos microrganismos está relacionado também com outras reações de oxidação, com o aumento das bases azotadas, da oxidação lipídica, e alterações na textura, na cor e no aumento do pH. Se observarmos os resultados obtidos para os parâmetros químicos e microbiológicos da amostra Ct no dia 12, verificamos que os valores de ABVT, de pH e dos microrganismos a 30°C, foram superiores às restantes amostras revestidas. Estes resultados demonstram a relação entre o crescimento microbiano e as restantes alterações de qualidade observadas.

## 5. Conclusão

---

O estudo de novas técnicas que permitam aumentar o tempo de prateleira do pescado fresco é importante, uma vez que atualmente o prazo de validade do pescado fresco varia entre 3 a 5 dias.

A aplicação de revestimentos é assim, uma alternativa ecológica e de baixo custo e que permite a manutenção da qualidade do pescado e consequente aumento do tempo de prateleira, sem comprometer as características da matéria-prima. No presente trabalho foram desenvolvidos revestimentos à base de gelatina extraída de pele de atum com a incorporação de extratos *Codium spp.* e extrato *Fucus vesiculosus*. Os revestimentos desenvolvidos foram adicionados por aspersão em filetes de atum fresco e o tempo de prateleira foi avaliado através de análises físico-químicas e microbiológicas ao longo de 12 dias com armazenamento à temperatura de refrigeração  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

A extração da gelatina de pele de atum que obteve maior rendimento foi realizada através da adição da pepsina, no qual foi possível obter um rendimento de  $28,67\pm 2,83\%$ .

Concluiu-se que as condições testadas na extração de gelatina irão influenciar o rendimento final obtido, existindo um aumento do rendimento com a utilização de pepsina.

O revestimento de gelatina de pele de atum com extrato de *Fucus vesiculosus* foi o que apresentou maior capacidade de antioxidante.

A aplicação do revestimento formulados nos lombos de atum não demonstraram qualquer efeito nas propriedades físico-químicas e microbiológicas avaliadas, ao tempo 0 (dia 0). Sendo um aspeto importante a demonstração que o revestimento não afeta as propriedades físico-químicas, uma vez que os revestimentos utilizados não alteram a cor dos lombos, assim o consumidor não será induzido a rejeitar o produto.

Ao longo do tempo de armazenamento foi possível verificar que as amostras revestidas mantiveram os parâmetros pH,  $a^*$ , TBARS, ABVT, textura (firmeza) e TVC mais estáveis relativamente ao controlo.

Do presente trabalho foi possível observar que a aplicação do revestimento de gelatina com adição de extrato de alga, *Codium spp.* e *Fucus vesiculosus*, permitiu manter a qualidade dos filetes revestidos até 9 dias de armazenamento.

A formulação/desenvolvimento de revestimentos com gelatina de peixe poderá ser um modo de valorizar os subprodutos da indústria do pescado, e o seu enriquecimento

com extratos de algas permitirá a aplicação num maior número de produtos e a valorização económica dos recursos marinhos.

## **6. Perspetivas futuras**

---

Seria interessante efetuar mais estudos à gelatina de pele de peixe como o desenvolvimento de um protocolo ou método de extração “amigo do ambiente” e com um maior rendimento de extração.

A avaliação sensorial das amostras, com recurso a painéis especializados será de elevada importância, para verificar se notam alterações entre o atum com e sem revestimento

Testar novas concentrações de gelatina e de extrato de algas e testar diferentes métodos de aplicação no peixe. Seria ainda interessante, aplicar este revestimento com extratos de algas no atum fresco, combinando com métodos de embalagem diferentes e ainda com recurso à atmosfera modificada e ao vácuo.

Por fim, avaliar a utilização de gelatina de peixe enriquecida com extratos de algas na extensão de outros produtos alimentares, nomeadamente em diferentes produtos minimamente processados e produtos prontos-a-consumir.

## Referências bibliográficas

---

Abdelmalek, B. E., Gómez-Estaca, J., Sila, A., Martiniz-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M. C., Chaabouni-Ellouz, S., Ayadi, M. A., Bougatef, A. (2016). Characteristics and functional properties of gelatin extracted from squid (*Loligo vulgaris*) skin. *Food Science and Technology*, 65, 924-931.

Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28, 189-199.

Alemán, A, Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 407-413.

Alfaro, A. T. (2008). Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Alfaro, A. T., Biluca, F. C., Marquetti, C., Tonial, I., Souza, N. E. (2014). African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin: Extraction optimization and physical-chemical properties. *Food Research International*, 65, 416-422.

Andrade, P. (2006). Avaliação do prazo de validade comercial do atum (*Thunnus atlanticus*) armazenado sob refrigeração. Dissertação de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Chemists. Gaithersberg, Maryland, USA.

Arnesen, J. A., Gildberg, A. (2007). Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, 98, 53-57.

Augusto, A. L. S. (2013). Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para produtos de IV gama. Dissertação em Mestrado de Biotecnologia dos Recursos Marinhos, IPL- Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche.

Augusto, A., Simões, T., Pedrosa, R., Silva, S. J. (2016). Evaluation of seaweed extracts functionality as post-harvest treatment for minimally processed Fuji apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 589-595.

Badii, F., Howell, N. K. (2006). Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20, 630-640.

Bandarra, N., Batista, I., Nunes, M., Empis, J., Christie, W. (1997). Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Science*, 62, 40-42.

Bandarra, N., Calhau, M. A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M. G., Bártolo, H., Faria, M. R., Fonseca, M. C., Gonçalves, J., Batista, I., Nunes, M. L. (2004). Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR). Publicações Avulsas do IPIMAR N°11, Lisboa.

Bandeira, S. F. (2009). Extração e caracterização da gelatina obtida de cabeças de carpa (*Aristichthys mobilis*). Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande.

Basu, T. K., Temple, N. J., Garg, M. L. (1999). Antioxidants in Human Health and Disease. CABI Publishing, New York. USA.

Beirão da Costa, S. M. M. (1998). Conservação de Maçã Bravo de Esmolfe por Aplicação de Filmes Edíveis. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, 69.

Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y., Roytrakul, S. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. Food Chemistry, 116, 445-451.

Beraquet, N. J., Lindo, M. M. K. (1985). Transformações bioquímicas Post Mortem em pescado. Boletim do ITAL 22, 169-192

Binsi, P.K., Shamasundar, B. A., Dileep, A. O., Badii, F., Howell, N. K. (2009). Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. Food Hydrocolloids, 23, 132-145.

Blanco-Pascual, N., Montero, M. P., Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. Food Hydrocolloids, 37, 100–110.

Block, B. A., Dewar, H., Blackwell, S. B., Williams, T. D., Prince, E. D., Farwell, C. J., Boustany, A., Teo, S. L., Seitz, A., Walli, A., Fudge, D. (2001). Migratory movements, depth preferences and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. Science, 293, 1310–1314.

Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. Journal of Food Engineering, 110 (2), 208-213.

Cardoso, C., Bandarra, N., Lourenço, H., Afonso, C., Nunes, M. (2010). Methylmercury Risks and EPA + DHA Benefits Associated with Seafood Consumption in Europe. Risk Analysis, 30, (5), 827-840.

Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT – Food Science and Technology. 41, 1067–1072.

Chiou, B.S., Avena-Bustillos, R. J., Shey, J., Yee, E., Bechtel, P. J., Imam, S. H., Glenn, G. M., Orts, W. J. (2006). Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. *Polymer*, 47, 6379–6386.

Chiumarelli, M., Hubinger, M. D., (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch – Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids*, 28 (1), 59-67.

Cho, S. M., Gu, T. S.; Kim, S. B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 19, 221-229.

Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H., Lee, Y. B., Kim, S. B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, 18, 573-579.

Choe, E.; Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 345-358.

Costa, E., Melo, T., Moreira, A. S. P., Alves, E., Domingues, P., Calado, R., Abreu, M. H., Domingues, M. R. (2015). Decoding bioactive polar lipid profile of the macroalgae *Codium tomentosum* from a sustainable IMTA system using a lipidomic approach. *Algal Research*, 12, 388-397.

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor R., Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46 , 409-421.

Díaz-Rubio, M.E., Pérez-Jiménez, J. and Saura-Calixto, F. (2008) Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 1-12.

Direção-Geral das Pescas e Aquicultura (DGPA) (2008). Guia de identificação dos atuns do Atlântico. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Duan, J., Cherian, G., Zhao, Y. (2010). Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chemistry*, 119 (2), 524-532

Embuscado, M. E., Huber, K. C. (2009). Edible films and coating for food applications. Springer.

European Commission (2016). Facts and figures on the Common Fisheries Policy. Basic statistical data, 2016 Edition. European Union. Bélgica.

FAOa. Species Fact Sheets: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839). Fisheries and Aquaculture Department. Acedido a Novembro 13, 2015, disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/2498/en>.

FAO (2014). O comércio global de pescado atinge níveis recordes. Acedido a Outubro 28, 2015, disponível em <http://www.fao.org/news/story/pt/item/214518/icode/>.

FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200.

Feng, X., Bansal, N., Yang, H. (2016). Fish gelatin combined with chitosan coating inhibits myofibril degradation of golden pomfret (*Trachinotus blochii*) fillet during cold storage. Food Chemistry, 200, 283-293.

Fernandes, P. (2012). Consumo de pescado em Portugal. Riscos e alimentos: pescado. ASAE, 4, 4-6.

Fernández-Díaz, M. D., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. (2003). Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. Food Hydrocolloids, 17(2), 281–286.

Fernández-Díaz, M. D., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. (2001). Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadua morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by the coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. Food Chemistry, 74, 161–167.

Ferreira, M. F. (2013). Extração e caracterização de gelatina proveniente de subprodutos do frango: pés. Curso Superior de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Fonteneau, A., Ariz, J., Delgado, A., Pallares, P., Pianet, R. (2005). A comparison of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) stocks and fisheries in the Atlantic, Indian and Pacific ocean. ICCAT, 57, 41-66.

Galus, S., Kadzinska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings: Review. Trends in Food Science & Technology, 45, 273-283.

Gilsenan, P. M., Ross-Murphy, S. B., (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. Food Hydrocolloids, 14, 191-195.

GME (Gelatine Manufacturers of Europe) (2015). Acedido a Setembro 11, 2015, disponível em <http://gelatine.org/en.html>.

Gonçalves, A. I. S. R. (2010). Efeito da Aplicação de Revestimentos Comestíveis Enriquecidos em Antioxidantes na Conservação de Frutos Minimamente Processados. Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Universidade de Lisboa: Faculdade de Farmácia.

Gol, N.B., Patel, P. R., Rao, R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. Postharvest Biology and Technology, 85, 185-195.

- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. (2009b). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92, 78-85.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C. (2009a). Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. *Food Hydrocolloids*, 23, 1334-1341.
- Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food hydrocolloids*, 21, 1133-1143.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., Montero, P. (2009). Fish gelatin- a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 3-16.
- González Del Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Del Rio, M. J., Reina, G.G., Peláez, F. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.*, 4,35-40.
- Gudmundsson, M., Hafsteinsson, H. (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, 62, 37-47.
- Guerreiro, A. C, Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., Antunes, M. D. C. (2015). Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin- and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. *Scientia Horticulturae*, 194, 138-146.
- Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O. M., Nasri, M., Bougatef, A. (2012). Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 477-483.
- Heo, S.-J., Park, E.-J., Lee, W.-K., Jeon, Y.-J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 96 (14), 1613-1623.
- Hocaoğlu, A., Demirci, A., Gümüş, T., Demirci, M. (2012). Effects of gamma irradiation on chemical, microbial quality and shelf life of shrimp. *Radiation Physics and Chemistry*. 81, 1923-1929.
- Huss, H. H (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO fisheries technical paper*, 348.
- Huss, H. H. (1997). *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*. *FAO documento técnico sobre as pescas*, 334.

- Kadam, S. U., Pankaj, S. K., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., O'Donnell C. P. (2015). Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 68-74.
- Kaewdang, O., Benjakul, S. (2015). Effect of ethanolic extract of coconut husk on gel properties of gelatin from swim bladder of yellowfin tuna. *LWT – Food Science and Technology*, 62, 955-961.
- Kanatt, S.R., Rao, M. S., Chawla, S. P., Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, 53 (1), 321-326.
- Karim, A. A., Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, 563-576.
- Kelleher, K. (2005). Discards in the world's marine fisheries. An update. FAO Fisheries Technical Paper, 470. Acedido a Setembro 11, 2015, disponível em <http://www.fao.org/docrep/008/y5936e/y5936e09.htm>
- Khodabux, K., L'Omelette, M. S. S., Jhaumeer-Laulloo, S., Ramasami, P., Rondeau, P. (2007). Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. *Food Chemistry*, 102, 669-675.
- Koleva, I. (2007). New methods for the screening of antioxidants in three *Sideritis* species, Thesis Wageningen University.
- Lassoued, I., Jridi, M., Nasri, R., Dammak, A., Hajji, M., Nasri, M., Barkia, A. (2014). Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 41, 301-318.
- Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., Zhao, J. (2012). Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry*, 135, 140-145.
- Li, J-H., Miao, J., Wu, J-L., Chen, S-F., Zhang, Q-Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166-173.
- Lidon, F. e Silvestre, M. (2007). *Indústrias Alimentares – aditivos e tecnologia*. Lisboa: Escolar Editora.
- Liu, H., Li, D., Guo, S. (2008). Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatine from fish skins preserved by different methods. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1425-1430.
- Lopes, D. (2014). *Valorização de Pescado e Subprodutos: Tecnologias Alternativas e Garantia da Qualidade. Necessidades da indústria relativamente à valorização de subprodutos de pescado*. ALIF: Associação da Indústria Alimentar pelo

Frio. Acedido a Março 21, 2016, disponível em [https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/relatorios/pescas.mar/Necessidades\\_da\\_industria\\_para\\_valorizacao\\_subprodutos\\_Projeto\\_SECUREFISH\\_Dina\\_Lopes.pdf](https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/relatorios/pescas.mar/Necessidades_da_industria_para_valorizacao_subprodutos_Projeto_SECUREFISH_Dina_Lopes.pdf)

Lu, F., Ging, Y., Ye, X., Liu, D. (2010). Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (9), 1331-1335.

Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martinob, M. N., Zaritzky, N. E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 75 (4), 453-460.

Mancini, R. A., Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.

Mariod, A. A., Adam, H. F. (2013). Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technol. Aliment.*, 12 (2), 135-147.

Mastromatteo, M., Conte, A., Lucera, A., Saccotelli, M. A., Buonocore, G. G., Zambrini, A. V., Nobile, M. A. D. (2015). Packaging solutions to prolong the shelf life of Fiordilatte cheese: Bio-based nanocomposite coating and modified atmosphere packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 60 (1), 230-237.

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9, 29-35.

Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boschii*) skin collagen affect functional properties of the resultant gelatine. *J. Food Sci.*, 65, 434-438.

Mousakhani-Ganjeh, A., Hamdami, N., Soltanizadeh, N. (2015). Impact of high voltage electric field thawing on the quality of frozen tuna fish (*Thunnus albacares*). *Journal of Food Engineering*, 156, 39-44.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., Duodu, K. G. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 581-592.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. (2007). Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104, 593-601.

Norma Portuguesa 2032 (1988). Pescado. Determinação do teor de cinza. Instituto Português da Qualidade.

Norma Portuguesa 2079 (1989). Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade.

Norma Portuguesa 2930 (1988). Pescado. Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT). Método de Conway. Instituto Português da Qualidade.

Norma Portuguesa 3356 (1990). Pescado. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA). Método espectrofotométrico. Instituto Português da Qualidade.

Norma Portuguesa 4405 (2002). Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos – contagem de colónias a 30°C. Instituto Português da Qualidade.

Norma Portuguesa 4488 (2009). Produtos da pesca e da aquicultura. Determinação do teor de azoto total e cálculo do teor de proteína bruta. Instituto Português da Qualidade.

Nowzari, F., Shábanpour, B., Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 141, 1667-1672.

Nunes, M. L., Batista, I., Bandarra, N. M., Morais, M. G., Rodrigues, P. O. (2008). Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. *Publicações avulsas do IPIMAR*, 18, 77.

Oetterer, M., Regitano-D'arce, M. A. B., Spoto, M. H. F. (2006). *Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos*. Barueri: Manole; 2006.

Ogawa, M. (1999). *Manual de Pesca: Ciência e tecnologia do pescado*. Livraria Varela

Olaimat, A. N., Holley, R. A. (2015). Control of *Salmonella* on fresh chicken breasts by  $\kappa$ -carrageenan/chitosan-based coatings containing allyl isothiocyanate or deodorized Oriental mustard extract plus EDTA. *Food Microbiology*, 48, 83-88.

Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 85, 49–57.

Ozogul, Y., Ayas, D., Yazgan, H., Ozogul, F., Boga, E., Ozyurt, G. (2010). The capability of rosemary extract in preventing oxidation of fish lipid. *International Journal of Food Science & Technology*. 45, 1717-1723.

Park, H. J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 254-260.

Park, S., Marsh, K. S., Dawson, P. (2010). Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat Science*, 85(3), 493-499.

Parys, S., Kehraus, S., Krick, A., Glombitza, K.W., Carmeli, S., Klimo, K., Gerhauser, C., Konig, G. M. (2010). In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, 71 (2-3), 221-229.

Pascall, M. A., Lin, S. J. (2013). The application of edible polymeric films and coatings in the food industry. *Food Processing & Technology*, 4.

Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Martins, J. T., Teixeira, J. A., Vicente, A. A. (2010). Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicação alimentares. *Boletim de Biotecnologia*.

Rahman, S. M., Al-Saidi, G. S., Guizani, N. (2008). Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chemistry*, 108, 472-481.

Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos - Revisão. *Quim. Nova*, 29(4), 755-760.

Ramos, Ó. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Lopes-da-Silva, J. A., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95 (11), 6282-6292.

Rattaya, S., Benjakul, S., Prodpran, T. (2009). Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. *Journal of Food Engineering*, 95, 151-157.

Regulamento (CE) nº 853/2004. Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, L226/22 – L226-89.

Regulamento (CE) nº 1441/2007. Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentício. *Jornal Oficial da União Europeia*, L322/12 – L322-29.

Regulamento (CE) nº 1022/2008. Limites de azoto básico volátil total (ABVT). *Jornal Oficial da União Europeia*, L277/18 – L277-20.

Ruiz-Capillas, C., Moral, A. (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89, 347-354.

Sá, E. (2004). Conservação do pescado. *Aquicultura e Pesca*, Junho, edição 01

Sae-Leaw, T., Benjakul, S., O'Brien, N. M. (2016). Effects of defatting and tannic acid incorporation during extraction on properties and fishy odour of gelatin from seabass skin. *LWT -Food Science and Technology*, 65, 661-667.

- Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18, 566–575.
- Salvador, N., Garreta, A.G., Lavelli, L., Ribera, M. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*. 71, 101-113.
- Sant’Anna, V., Gurak, P. D., Marczak, L. D. F. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. *Dyes and pigments*, 98, 601-608.
- Santos, J. (2008). Filetes de pregado (*Psetta maxima*) embalados em atmosfera modificada: avaliação da qualidade física, química e microbiológica. Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade.
- Saeabia, A. I., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P. (2000). The effect of added salts on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. *Food Chemistry*, 70 (1), 71-76.
- Schrieber, R., Gareis, H. (2007). *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. WILEY-VCH.
- Segtnan, V. H., Kvaal, K., Rukke, E. O., Shuller, R. B., Isaksson, T. (2003). Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatine using near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17, 585-592.
- Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, S. G., Natarajaseenivasan, K. (2008). Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology*. 58 (3), 535-541.
- Shyni, K., Hema, G. S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C. G., Lakshmanan, P. T. (2014). Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocolloids*, 39, 68-76.
- Sikorski, Z. E. (1978). Protein changes in muscle of foods due freezing and frozen storage. *International Journal of Refrigeration*, 3 (1), 173–180.
- Sikorski, Z. E., A. Kolakowska (2002). *Chemical and functional properties of food lipids: 1- The Role of Lipids in Food Quality*. CRC Press. U.S.A. 388pp.
- Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Horta, A., Pedrosa, R. (2013). High antioxidant activity of sargassum *Muticum* and *Padina pavonica* collected from Peniche coast (Portugal). *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (1), S116.
- Silva, R. S. G., Bandeira, S. F., Pinto, L. A. A. (2014). Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). *LWT- Food Science and Technology*, 57,580-585.

- Slizytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44, 668–677.
- Smulevich, G., Droghetti, E., Focardi, C., Coletta, M., Ciaccio, C., Nocentini, M. (2007). A rapid spectroscopic method to detect the fraudulent treatment of tuna fish with carbon monoxide. *Food Chemistry*, 101 (3), 1071-1077.
- Soares, S.E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71-81.
- Sveinsdottir, K., Martinsdottir, E., Hyldig, G., Jørgensen, B., Kristbergsson, K. (2002). Application of Quality Index Method (QIM) Scheme in Shelf-life Study of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 67(4), 1570-1575.
- Szczesniak, A. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13, 215-225.
- Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. (2012). Principles and Methodologies for the Determination of Shelf-Life in Foods. *Trends in Food and Control Engineering*. InTech, 1, 1-42.
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V. D., Moldão-Martins, M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv *Camarosa*) under commercial storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 52 (2), 80-92.
- Viriyarattanasak, C., Matsukawa, S., Hamada-Sato, N., Watanabe, M., Suzuki, T. (2008). Quantitative measurement of metamyoglobin in tuna flesh via electron paramagnetic resonance. *Food Chemistry*, 111, 1050-1056.
- Volpe, M. G., Siano, F., Paolucci, M., Sacco, A., Sorrentino, A., Malinconico, M., Varricchio, E. (2015). Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 615-622.
- Walli, A., Teo, S., Boustany, A., Farwell, C., Williams, T., Dewar, H., Prince, E., Block, B. (2009). Seasonal movements, aggregations and diving behavior of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*) revealed with archival tags. *Plos one*, 4, e6151.
- Willensen, F. (2003). Report on the seafood consumption data found in the European countries of the OT-SAFE project WP3. Risk assessment of TBT in seafood in Europe. Institute for Environmental Studies, Amsterdam, 31-34.
- Wongwichian, C., Klomklao, S., Panpipat, W., Benjakul, S., Chaijan, M. (2015). Interrelationship between myoglobin and lipid oxidations in oxeye scad (*Selar boops*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 174, 279-285.

Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., Zhang, Q. (2013). Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 32, 42-51.

Wu, S. (2014). Effect of chitosan-based edible coating on preservation of white shrimp during partially frozen storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 325-328.

Wu, S., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J., Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2, 7-16.

Yang, S., Ma, J., Wu, Y., Fan, X., Jin, S., Chen, S. (2015). Relationship between temporal-spatial distribution of fishing grounds of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and thermocline characteristics in the Atlantic Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 35 (3), 1-9.

Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D., Ebato, T., Nomura, Y., Ishii, Y. (2000). Physical properties of shark gelatin compared with pig gelatin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2023-2027.

Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X., Sun, H. (2016). Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control*, 59, 818-823.

Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*. Pearson Prentice Hall, 5<sup>th</sup> Edition, 944.

Zhong, Y., Cavender, G., Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56, 1-8.

Zhou, P., Regenstein, J. M. (2005). Effects of alkaline and acid pretreatments on alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*, 70(6), C392-C396.

## **Anexos**

---

**Anexo 1:** Teor de humidade ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p<0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		Ct (p-value)	G (p-value)	GC (p-value)	GF (p-value)
<b>Dia 0</b>	<b>Dia 3</b>	0,964	<b>0,027</b>	0,532	0,938
	<b>Dia 6</b>	0,389	<b>0,003</b>	0,910	0,841
	<b>Dia 9</b>	0,521	<b>0,004</b>	0,676	0,678
	<b>Dia 12</b>	0,493	<b>0,002</b>	0,344	0,979
<b>Dia 3</b>	<b>Dia 6</b>	0,366	0,190	0,463	0,781
	<b>Dia 9</b>	0,550	0,268	0,306	0,734
	<b>Dia 12</b>	0,469	0,148	0,132	0,918
<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	0,150	0,821	0,760	0,540
	<b>Dia 12</b>	0,925	0,875	0,401	0,861
<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	0,222	0,702	0,586	0,659

**Anexo 2:** pH ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p<0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		Ct (p-value)	G (p-value)	GC (p-value)	GF (p-value)
<b>Dia 0</b>	<b>Dia 3</b>	---	0,068	0,312	0,686
	<b>Dia 6</b>	---	0,095	0,205	<b>0,005</b>
	<b>Dia 9</b>	---	0,057	0,059	<b>0,006</b>
	<b>Dia 12</b>	---	0,432	0,153	<b>0,002</b>
<b>Dia 3</b>	<b>Dia 6</b>	---	0,842	0,778	<b>0,01</b>
	<b>Dia 9</b>	---	0,921	0,312	<b>0,012</b>
	<b>Dia 12</b>	---	0,248	0,639	<b>0,003</b>
<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	---	0,765	0,457	0,892
	<b>Dia 12</b>	---	0,331	0,850	0,504
<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	---	0,213	0,574	0,425

--- Não existe homogeneidade ( $p>0,05$ )

**Anexo 3:** Os TBARS ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		Ct	G	GC	GF
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
Dia 0	Dia 6	<b>0,000</b>	<b>0,100</b>	<b>0,000</b>	<b>0,041</b>
	Dia 9	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
	Dia 12	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>
Dia 6	Dia 9	0,262	0,058	0,356	<b>0,019</b>
	Dia 12	0,939	<b>0,003</b>	0,573	0,060
Dia 9	Dia 12	0,331	0,095	0,705	0,484

**Anexo 4:** O ABVT ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		Ct	G	GC	GF
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
Dia 0	Dia 3	0,550	0,138	<b>0,025</b>	<b>0,002</b>
	Dia 6	0,076	0,142	<b>0,024</b>	0,538
	Dia 9	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>
	Dia 12	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>
Dia 3	Dia 6	0,195	0,984	0,978	<b>0,005</b>
	Dia 9	<b>0,006</b>	<b>0,013</b>	0,342	<b>0,001</b>
	Dia 12	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	0,159	<b>0,003</b>
Dia 6	Dia 9	<b>0,038</b>	<b>0,013</b>	0,355	<b>0,000</b>
	Dia 12	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	0,166	<b>0,000</b>
Dia 9	Dia 12	<b>0,008</b>	0,668	0,611	0,481

**Anexo 5:** Parâmetro L\* ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus*

*vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		Ct	G	GC	GF
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
Dia 0	Dia 3	0,700	0,971	0,790	0,558
	Dia 6	0,345	0,765	0,408	0,225
	Dia 9	0,480	0,932	0,653	0,436
	Dia 12	0,501	0,807	0,124	0,459
Dia 3	Dia 6	0,565	0,738	0,568	0,508
	Dia 9	0,743	0,903	0,853	0,842
	Dia 12	0,769	0,779	0,190	0,873
Dia 6	Dia 9	0,801	0,831	0,697	0,640
	Dia 12	0,775	0,956	0,433	0,613
Dia 9	Dia 12	0,973	0,874	0,251	0,968

**Anexo 6:** Parâmetro  $L^*$  ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
Ct	G	0,522	0,290	0,229	0,269	0,422
	GC	0,508	0,848	0,843	0,912	0,606
	GF	0,970	0,856	0,579	0,661	0,708
G	GC	0,210	0,219	0,305	0,314	0,204
	GF	0,499	0,372	0,490	0,484	0,659
GC	GF	0,531	0,709	0,719	0,742	0,382

**Anexo 7:** Parâmetro  $a^*$  ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus*

*vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		<b>Dia 0</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
<b>Ct</b>	<b>G</b>	0,810	0,146	0,730	0,948	0,967
	<b>GC</b>	0,404	0,210	0,392	0,708	0,526
	<b>GF</b>	0,555	0,588	0,384	0,766	0,504
<b>G</b>	<b>GC</b>	0,292	0,811	0,599	0,756	0,500
	<b>GF</b>	0,412	0,326	0,588	0,816	0,529
<b>GC</b>	<b>GF</b>	0,798	0,447	0,986	0,938	0,210



























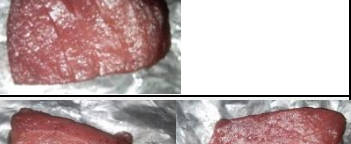

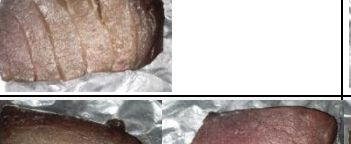





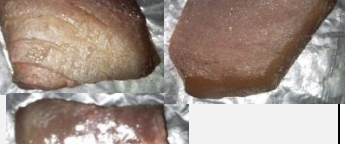




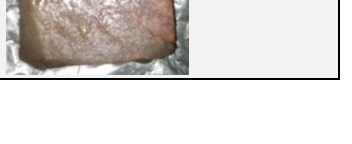
**Anexo 8:** Parâmetro  $b^*$  ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		<b>Ct</b>	<b>G</b>	<b>GC</b>	<b>GF</b>
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
<b>Dia 0</b>	<b>Dia 3</b>	0,888	0,781	0,861	0,790
	<b>Dia 6</b>	0,798	0,799	0,950	0,776
	<b>Dia 9</b>	0,766	0,564	0,947	0,851
	<b>Dia 12</b>	0,726	0,271	0,906	0,613
<b>Dia 3</b>	<b>Dia 6</b>	0,908	0,982	0,910	0,986
	<b>Dia 9</b>	0,875	0,762	0,913	0,936
	<b>Dia 12</b>	0,625	0,399	0,954	0,445
<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	0,967	0,744	0,997	0,923
	<b>Dia 12</b>	0,547	0,387	0,956	0,435
<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	0,521	0,582	0,959	0,492

**Anexo 9:** Parâmetro b\* ao longo do armazenamento das amostras de atum, controle (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD).

		<b>Dia 0</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>
		(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)	(p-value)
<b>Ct</b>	<b>G</b>	0,666	0,327	0,401	0,301	0,446
	<b>GC</b>	0,363	0,750	0,827	0,889	0,556
	<b>GF</b>	0,926	0,886	0,988	0,906	0,965
<b>G</b>	<b>GC</b>	0,196	0,207	0,298	0,246	0,195
	<b>GF</b>	0,601	0,267	0,409	0,354	0,422
<b>GC</b>	<b>GF</b>	0,411	0,860	0,815	0,796	0,585

Anexo 10: Amostras de atum ao longo do armazenamento, ao Dia 0, 3, 6, 9 e 12.

	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12
Ct					
					
G					
					
GC					
					
GF					
					



**Anexo 11:** Parâmetro a\* ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada dia de análise (p<0,05, ANOVA, teste de LSD).

		<b>Dia 0</b> (p-value)	<b>Dia 3</b> (p-value)	<b>Dia 6</b> (p-value)	<b>Dia 9</b> (p-value)	<b>Dia 12</b> (p-value)
<b>Ct</b>	<b>G</b>	0,286	0,401	0,751	0,168	0,585
	<b>GC</b>	0,916	0,376	0,337	0,174	0,073
	<b>GF</b>	0,256	0,369	0,941	0,128	0,200
<b>G</b>	<b>GC</b>	0,332	0,962	0,214	0,977	0,130
	<b>GF</b>	0,938	0,950	0,697	0,842	0,378
<b>GC</b>	<b>GF</b>	0,298	0,988	0,372	0,820	0,464

**Anexo 12:** A contagem dos microrganismos mesófilos a 30°C ao longo do armazenamento das amostras de atum, controlo (Ct), gelatina (G), gelatina com extrato de *Codium spp* (GC) e gelatina com extrato de *Fucus vesiculosus* (GF). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas em cada tratamento (p<0,05, ANOVA, teste de LSD).

		<b>Ct</b> (p-value)	<b>G</b> (p-value)	<b>GC</b> (p-value)	<b>GF</b> (p-value)
<b>Dia 0</b>	<b>Dia 3</b>	---	---	0,867	---
	<b>Dia 6</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
	<b>Dia 9</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
	<b>Dia 12</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
<b>Dia 3</b>	<b>Dia 6</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
	<b>Dia 9</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
	<b>Dia 12</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	---	---	<b>0,002</b>	---
	<b>Dia 12</b>	---	---	<b>0,000</b>	---
<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	---	---	0,119	---

--- Não existe homogeneidade (p>0,05)