



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

JEFFERSON SILVA FERREIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA
RODOFÍCEA *Gracilaria birdiae* EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA OBTIDA
DE RESÍDUOS DE FILETAGEM DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

FORTALEZA

2019

JEFFERSON SILVA FERREIRA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA
RODOFÍCEA *Gracilaria birdiae* EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA OBTIDA DE
RESÍDUOS DE FILETAGEM DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientadora: Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo.

Coorientador: Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F441a Ferreira, Jefferson Silva.
Atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria birdiae* em carne mecanicamente separada obtida de resíduos de filetagem de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Jefferson Silva Ferreira. – 2019.
63 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo.
Coorientação: Prof. Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues.
1. Tilápia-do-Nilo. 2. Minced Fish. 3. Rodofícea. 4. Polissacarídeos Sulfatados. 5. Antioxidantes Naturais. I. Título.
-

JEFFERSON SILVA FERREIRA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA
MARINHA *Gracilaria birdiae* EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA OBTIDA DE
RESÍDUOS DE FILETAGEM DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico essa monografia à Deus, aos meus pais, à minha esposa e ao meu filho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida.

Aos meus pais Gerlany Silva de Oliveira e Manuel Assuero de Oliveira e a minha esposa Francisca Aurélia Rodrigues de Mesquita Neta que me apoiaram durante o curso de Engenharia de Pesca.

A minha orientadora Profa. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo pela excelente orientação e treinamento.

Ao meu co-orientador Dr. José Ariévil Gurgel Rodrigues pelos ensinamentos e correções.

Aos professores colaboradores Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC); Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC) e Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Departamento de Engenharia de Pesca/UFC), que disponibilizaram os laboratórios para realização dos experimentos do presente trabalho.

As colegas de bancada, Ariadne Elisa Queiroz de Oliveira, Brenda Lopes Ribeiro e Ana Larissa Brandão Rodrigues do Laboratório de Processamento do Pescado (LAPROP) e Cybele Pinheiro Guimarães do Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE) pela contribuição e ajuda durante os experimentos.

A Dra. Ana Irene Martins da Silva e a MSc Claudia Cinthia Santos de Oliveira pela orientação nos experimentos realizados no Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq).

RESUMO

A indústria pesqueira gera uma grande quantidade de resíduos proteicos com alto valor nutricional. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais cultivada no Brasil, tendo o maior potencial de aproveitamento de resíduos. No entanto, os resíduos utilizados na elaboração da carne mecanicamente separada (CMS) são mais suscetíveis à oxidação lipídica, sendo necessária a adição de antioxidantes. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante do polissacarídeo sulfatado total (PST) da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* na CMS de tilápia-do-Nilo, como alternativa ao antioxidante sintético *hidroxitolueno butilado* (BHT). O PST foi obtido por extração aquosa refinada (1,5% m/v; 80°C; 4h) e determinado seu rendimento com base na massa desidratada. Foram determinados os teores de açúcares totais, sulfato e proteínas, como também verificado o padrão de cargas por eletroforese em gel de agarose (0,5%), utilizando glicosaminoglicanos como padrões. Na avaliação do potencial antioxidante do PST (0,125 - 4mg/mL) foi realizada avaliação *in vitro* do potencial redutor do radical livre *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) e o efeito de quelação do íon-ferroso, utilizando o BHT e o *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) como padrões, respectivamente. Os PST obtidos por EAqRef foram aplicados na CMS de tilápia-do-Nilo não lavada em diferentes concentrações (0,01; 0,02 ou 0,03 g/100g), o controle positivo recebeu o antioxidante BHT (0,01 g/100g) e o controle sem aditivo. A CMS tratada foi armazenada a -22°C durante 180 dias e avaliada quanto ao teor de umidade, lipídios, proteínas e cinzas, no início e no fim do experimento, além de verificados o potencial hidrogeniônico (pH), a formação das bases voláteis totais e a oxidação lipídica. Foram feitas análises microbiológicas iniciais para coliformes termotolerantes à 45°C, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp. no tempo zero e realizada a contagem padrão para bactérias psicrotróficas durante o experimento. O rendimento bruto de PSTs de *Gracilaria birdiae* foi de 36,81±16,01% a partir da matéria prima desidratada. O conteúdo de açúcares totais e sulfato livre foram de 77,39% e 3,00%, respectivamente. Não foi detectada proteínas na amostra do polímero examinado. O perfil eletroforético revelou PST polidisperso com mobilidade semelhante ao dermatan sulfato de mamífero. Os ensaios antioxidantes de redução do radical livre DPPH e quelação do íon ferroso, mostraram dependentes de concentração (0,125 - 4 mg/mL) e foram, em ambos os casos, menos efetivos que os controles BHT e EDTA (p<0,05). A composição centesimal da CMS sofreu poucas alterações

ao longo do armazenamento congelado, sendo mais significativa a redução de umidade entre os tratamentos ($p < 0,05$). A CMS tratada com PST apresentou crescimento de microrganismos psicotróficos e aumento do nitrogênio das bases voláteis totais durante o armazenamento congelado, porém não houve crescimento de bactérias controladas pela legislação e o pH manteve-se estável durante o experimento. Além disso, houve redução na formação do teor de malonaldeído nas concentrações de 0,01 e 0,02 g/100g ($p < 0,05$). Portanto, o PST da alga marinha vermelha *G. birdiae* mostra como uma alternativa ao antioxidante sintético BHT, quando aplicado em CMS de tilápia.

Palavras-chave: Tilápia-do-Nilo. *Minced Fish*. Rodofíceas. Polissacarídeos Sulfatados. Antioxidantes Naturais.

ABSTRACT

The fishery industry generates a large quantity of protein residues with high nutritional value. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most widely cultivated fish species in Brazil, with the greatest potential for waste recovery. However, residues used in the preparation of mechanically separated meat (MSM) are more susceptible to lipid oxidation, and the addition of antioxidants is necessary. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of the total sulfated polysaccharide (TSP) of the red sea kelp *Gracilaria birdiae* in the Nile tilapia MSM as an alternative to the synthetic butylated hydroxytoluene (BHT) antioxidant. PST was obtained by refining aqueous extraction (1.5% w/v, 80°C, 4h) and determined its yield based on the dehydrated mass. The total sugars, sulfate and protein contents were determined, as well as the agarose gel electrophoresis load standard (0.5%), using glycosaminoglycans as standards. In the evaluation of the antioxidant potential of the TSP (0.125 - 4mg/mL), the in vitro evaluation of the free reducing potential of 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and the ferrous ion chelation effect was performed using BHT and Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as standards, respectively. The TSP obtained by RefAqE was applied to the MSM of unwashed Nile tilapia at different concentrations (0.01, 0.02 or 0.03 g/100g), the positive control received the antioxidant BHT (0.01 g/100g) and the control without additive. The treated CMS was stored at -22°C for 180 days and evaluated for moisture content, lipids, proteins and ash at the beginning and at the end of the experiment, as well as the potential of hydrogen (pH), the formation of total volatile bases and lipid oxidation. Initial microbiological analyzes were performed for thermotolerant coliforms at 45°C, coagulase positive staphylococci and *Salmonella* sp. at time zero and performed the standard count for psychrotrophic bacteria during the experiment. The crude yield of TSPs from *Gracilaria birdiae* was 36.81±16.01% from the dehydrated raw material. The content of total sugars and free sulfate were 77.39% and 3.00%, respectively. No proteins were detected in the sample of the polymer examined. The electrophoretic profile revealed polydisperse TSP with similar mobility to mammalian dermatan sulfate. The antioxidant free radicals DPPH reduction and ferrous ion chelation showed concentration-dependent (0.125 - 4 mg/mL) and were both less effective than BHT and EDTA (p<0.05). The centesimal composition of CMS underwent few changes throughout the frozen storage, being more significant the reduction of humidity among the treatments (p<0.05). The MSM treated with PST

showed growth of psychotrophic microorganisms and increase of the nitrogen of the total volatile bases during the frozen storage, but there was no growth of bacteria controlled by the legislation and the pH remained stable during the experiment. In addition, there was reduction in the formation of malonaldehyde content at concentrations of 0.01 and 0.02 g/100g ($p < 0.05$). Therefore, the TSP of the red seaweed *G. birdiae* shows as an alternative to the synthetic antioxidant BHT, when applied in CMS of tilapia.

Keywords: Nile tilapia. Minced Fish. Rhodophyceae. Sulphated Polysaccharides. Natural Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura química básica das agaranas..... | 21 |
| Figura 2 - Alga marinha <i>Gracilaria birdiae</i> | 31 |
| Figura 3 - Determinação de microrganismos psicrotróficos pelo método de plaqueamento. | 39 |
| Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose (0,5%) do PST da <i>Gracilaria birdiae</i> | 41 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – Redução do radical livre DPPH em diferentes concentrações do PST obtido da rodófito <i>G. birdiae</i> | 43 |
| Gráfico 2 – Ensaio de quelação do íon ferroso em diferentes concentrações de PST..... | 44 |
| Gráfico 3 – Evolução do pH da CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias de estocagem sob congelamento..... | 47 |
| Gráfico 4 – Evolução do N-BVT da CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias de estocagem sob congelamento..... | 48 |
| Gráfico 5 – Evolução do teor de malonaldeído da CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias de estocagem sob congelamento. | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Rendimento e composição química (%) dos PSTs da alga marinha <i>Gracilaria birdiae</i> | 40 |
| Tabela 2 - Composição química centesimal inicial e final da CMS de tilápia-do-Nilo armazenada sob congelamento durante 180 dias. | 46 |
| Tabela 3 - Contagem inicial de bactérias controladas por legislação em CMS de tilápia-do-Nilo tratadas com os PST da <i>G. birdiae</i> | 50 |
| Tabela 4 – Crescimento microbiológico de bactérias heterotróficas psicrotróficas em CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias sob congelamento. | 52 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 18 |
| 2.1 | Produção da algicultura mundial e as características da produção algal brasileira. | 18 |
| 2.2 | Considerações sobre polissacarídeos sulfatados de algas marinhas | 19 |
| 2.3 | Piscicultura no Brasil | 21 |
| 2.4 | Tilápia-do-Nilo e sua aceitabilidade..... | 23 |
| 2.5 | A deterioração do pescado | 23 |
| 2.6 | Avaliação da qualidade do pescado | 25 |
| 2.7 | Composição química do pescado..... | 26 |
| 2.8 | O aproveitamento de resíduos do processamento de pescado..... | 26 |
| 2.9 | Carne mecanicamente separada (CMS) | 28 |
| 2.10 | Estabilidade da CMS sob congelamento..... | 29 |
| 2.11 | Alternativa aos antioxidantes comerciais utilizados em pescado..... | 29 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1 | Coleta da alga marinha | 31 |
| 3.2 | Extração do polissacarídeo sulfatado Total (PST) | 32 |
| 3.3 | Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados..... | 33 |
| 3.3.1 | <i>Determinação do conteúdo de carboidratos totais</i> | <i>33</i> |
| 3.3.2 | <i>Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes.....</i> | <i>33</i> |
| 3.3.3 | <i>Determinação do conteúdo de sulfato</i> | <i>33</i> |
| 3.4 | Eletroforese em gel de agarose | 33 |
| 3.5 | Análise da atividade antioxidante <i>in vitro</i>..... | 34 |
| 3.5.1 | <i>Inibição do radical livre 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).....</i> | <i>34</i> |
| 3.5.2 | <i>Análise de quelação do íon-ferroso.....</i> | <i>34</i> |
| 3.6 | Adição do PST à CMS de tilápia e avaliação dos parâmetros de controle de qualidade durante a estocagem sob congelamento | 35 |
| 3.6.1 | <i>Obtenção da Carne Mecanicamente Separada (CMS)</i> | <i>35</i> |
| 3.6.2 | <i>Tratamento da CMS de tilápia com PST da rodofíceia <i>G. birdiae</i>.....</i> | <i>35</i> |
| 3.7 | Composição química da CMS de tilápia-do-Nilo | 36 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.7.1 | <i>Umidade</i> | 36 |
| 3.7.2 | <i>Proteína bruta</i> | 36 |
| 3.7.3 | <i>Lipídios totais</i> | 37 |
| 3.7.4 | <i>Cinzas</i> | 37 |
| 3.8 | Avaliação dos parâmetros físico-químicos | 37 |
| 3.8.1 | <i>Potencial hidrogeniônico (pH)</i> | 37 |
| 3.8.2 | <i>Bases nitrogenadas voláteis totais (N-BVT)</i> | 37 |
| 3.8.3 | <i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> | 38 |
| 3.9 | Análise microbiológica | 38 |
| 3.10 | Análise estatística | 39 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 4.1 | Rendimento e composição química do PST da alga marinha vermelha <i>G. birdiae</i> ... | 40 |
| 4.2 | Eletroforese em gel de agarose | 41 |
| 4.3 | Atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados da <i>Gracilaria birdiae</i> | 42 |
| 4.3.1 | <i>Ensaio de redução do radical livre DPPH</i> | 42 |
| 4.3.2 | <i>Ensaio de quelação do íon-ferroso</i> | 43 |
| 4.4 | Análises químicas, físico-químicas e microbiológicas | 44 |
| 4.4.1 | <i>Composição centesimal</i> | 44 |
| 4.4.2 | <i>Potencial hidrogeniônico (pH)</i> | 46 |
| 4.4.3 | <i>Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)</i> | 47 |
| 4.4.4 | <i>Oxidação lipídica pela determinação das SRATB</i> | 48 |
| 4.4.5 | <i>Coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e <i>Salmonella sp.</i></i> | 50 |
| 4.4.6 | <i>Contagem padrão em placas para bactérias psicrotróficas</i> | 50 |
| 5 | CONCLUSÕES | 53 |
| | REFERÊNCIAS | 54 |
| | ANEXOS | 60 |

1 INTRODUÇÃO

O termo pescado refere-se a organismos vivos que habitam ambientes aquáticos de água doce ou marinha, incluindo estuários, em sua totalidade ou que em alguma fase passam por este ecossistema e que sirvam para alimentação humana. Entre eles, peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios, mamíferos, e algas, são exemplos de pescado (BRASIL, 2017).

Nas últimas décadas a produção pesqueira de algas marinhas vem se destacando no cenário mundial graças ao seu grande volume produtivo, cerca de 30 milhões toneladas/ano, e sua rentabilidade, além do apelo por alimentos funcionais. Entre as algas marinhas mais cultivadas, destacam-se *Eucheuma* spp. (34,9%), *Laminaria japônica* (27,3%), *Gracilaria* spp. (13,8%), *Undaria pinnatifida* (6,9%) e *Kappaphycus alvarezii* (5,1%) (FAO, 2018). As algas possuem biomoléculas com diversas aplicações, tais como polifenóis, carotenoides, pigmentos, enzimas e polissacarídeos. Na indústria alimentícia, os polissacarídeos sulfatados de algas são os compostos mais explorados em razão de suas características de formar géis. Os polissacarídeos sulfatados mais encontrados em algas são: as carragenanas, as agaranas, os alginatos e as fucanas (RINAUDO, 2008).

A pesca extrativa a nível comercial estabilizou-se na década de 80, sendo que o tamanho atual das capturas corresponde ao valor de 90,9 milhões de toneladas, representando um decréscimo comparado à produção obtida na década de 80 que obteve uma produção de 99,5 milhões de toneladas. Em contrapartida, a aquicultura nos últimos anos tem mostrado um aumento em sua produção, passando de uma produção de cerca de 12 milhões no final da década de 80 para uma produção de cerca de 80 milhões de toneladas em 2017 (FAO, 2019).

No Brasil, a produção aquícola de peixes se dá pela produção expressiva da tilápia-do-Nilo devido seu bom desempenho zootécnico, como adaptação ao cultivo e manejo intensivo, resistência às doenças, tolerância a acidez e alcalinidade elevadas, crescimento e reprodução em ampla faixa de salinidade e tolerância a concentrações elevadas de amônia etc. Considerando o grande potencial produtivo do Brasil, a produção aquícola está muito abaixo da sua capacidade quando comparado aos países orientais. Embora o produtor enfrente entraves ambientais e políticos, a produção de tilápia-do-Nilo colocou o Brasil na quarta posição de maior produtor mundial de tilápias com 357 mil toneladas/ano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2018). O crescimento da produção de tilápia no Brasil se deve por sua grande

aceitação de mercado, a oferta constante de produto de alta qualidade, ao domínio da tecnologia de produção em tanques-rede e ao déficit na oferta de pescado no país (KUBITZA, 2013).

A industrialização do pescado gera uma grande quantidade de resíduos que podem ser aproveitados ainda como produtos de valor agregado. A proteína do pescado possui elevado valor nutricional, além de possuir ácidos graxos ômega-3, incentivando o desenvolvimento de diversos produtos para alimentação, como a carne mecanicamente separada (CMS), que gera subprodutos com valor agregado, além de reduzir os impactos negativos da atividade industrial ao meio ambiente (GONÇALVES, 2011).

Algumas características do pescado o tornam um produto altamente perecível, como elevada atividade de água, composição química, teores de gorduras insaturadas e pH próximo da neutralidade (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Nesse contexto, deve-se atentar para o adequado armazenamento de peixes e seus subprodutos.

Em relação à CMS, ela está mais propícia a sofrer deterioração devida o maior tempo de manipulação e maior área de contato com o oxigênio que promove a oxidação de seus ácidos graxos. Entende-se por CMS, o produto congelado, obtido de pescado, envolvendo o descabeçamento, a evisceração, a limpeza destes e a separação mecânica da carne das demais estruturas inerentes à espécie, como espinhas, ossos e pele (BRASIL, 2017).

Na indústria de beneficiamento de pescado, tem-se utilizado compostos químicos sintéticos, como o *hidroxitolueno butilado* (BHT) e o *butylated hydroxyanisole* (BHA) como agentes antioxidantes na CMS de pescado, o que aumenta consideravelmente sua vida de prateleira. No entanto, esses compostos se não forem rigorosamente controlados, podem ocasionar alterações mutagênicas nas células, como foi observado em animais (CHEN; PEARSON; GRAY, 1992).

Algumas alterações na qualidade do pescado podem ser acompanhadas pelo acúmulo de compostos nitrogenados que podem ser vistos como uma prova da ação degenerativa promovida por enzimas e bactérias, sendo os compostos mais frequentes: a trimetilamina, a amônia e os ácidos voláteis. Outra preocupação é com a presença de microrganismos sobre os quais a legislação estabelece limites. Esses microrganismos podem não alterar a aparência do pescado, mas podem ser patogênicos para o homem e não somente deteriorantes do alimento (VIEIRA *et al.*, 2004).

Segundo Ogawa e Maia (1999) o músculo do pescado pode conter de 60 a 85% de umidade, cerca de 20% de proteína, de 1 a 2% de cinza, de 0,3 a 1,0% de carboidrato e de 0,6 a 36% de lipídios. Dentre essas classes químicas, os lipídios são os que mais sofrem variação do tipo de músculo corporal numa mesma espécie, sexo, idade, época do ano, habitat e dieta entre outros fatores.

No beneficiamento do pescado e no aproveitamento de resíduos originados desse processo, há uma grande preocupação com as gorduras, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados, pela facilidade de sofrerem oxidação, acarretando em alterações dos atributos sensoriais, como na qualidade final do produto, diminuição da qualidade ou até mesmo na rejeição do pescado (SOARES; GONÇALVES, 2012a).

Diante do exposto, as algas marinhas são uma fonte em potencial de biomoléculas capazes de ajudar a inibir a oxidação lipídica, como também uma alternativa aos antioxidantes sintéticos que são aplicadas em produtos cárneos, por exemplo, a CMS de tilápia-do-Nilo, por não apresentarem toxicidade e promover a estabilidade no armazenamento prolongado (SANTOS RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico dos PSs da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* frente à oxidação lipídica ao longo do armazenamento prolongado da CMS de tilápia-do-Nilo, obtida de resíduos de filetagem, como alternativa aos antioxidantes sintéticos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produção da algicultura mundial e as características da produção algal brasileira

A algicultura é o cultivo de algas, compreende-se nesse sentido, o cultivo de seres microscópicos (fitoplâncton) e macroscópicos, principalmente as algas de ecossistema marinho. Segundo dados da FAO (2018), a produção algal provinda da aquicultura foi estimada em 30 milhões de toneladas/ano, dentre os grandes países produtores destacam-se a China (47,9%), Indonésia (38,7%) e Filipinas (4,7%). Dentre as 40 espécies que compõem a produção em 2016, as cinco espécies mais cultivadas são: *Eucheuma* spp. (34,9%), *Laminaria japônica* (27,3%), *Gracilaria* spp. (13,8%), *Undaria pinnatifida* (6,9%) e *Kappaphycus alvarezii* (5,1%).

Considerando a produção total em 2004 de 15 milhões toneladas/ano, a produção mais recente de 30 milhões toneladas/ano é o dobro do que foi produzido em 2004, o que torna evidente o interesse econômico na produção de algas. O incremento na produção algal nos últimos anos ocorreu na Indonésia, em detrimento do aumento produtivo de *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* spp., que cresceu drasticamente devido a produção de carragenana. No leste e sudeste da Ásia, o cultivo da espécie *Undaria pinnatifida*, dá-se principalmente para o consumo direto, o que tem estimulado sua produção. Os dados referentes à produção total de microalgas são muito escassos, o que subestima sua produção. Tendo como referência 11 países produtores de microalgas, a produção total de microalgas estimada foi de 89 mil toneladas em 2016. As principais espécies cultivadas foram *Spirulina* spp., *Chlorella* spp., *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis* spp.

Localizada em regiões entre marés, ligada diretamente ao substrato rochoso, a alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* é encontrada o ano inteiro ao longo da costa brasileira a partir do estado do Ceará até o estado do Espírito Santo. Possui talo ereto, apresenta ramificações com no máximo quatro prolongamentos, pode alcançar até 46 cm de altura e 2,3 mm de largura. As ramificações apresentam-se subdicotômicas ou unilaterais. Possui um ou mais eixos principais, centrados em um único disco rígido. A coloração varia de vermelho claro a escuro (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002).

O Brasil, ao contrário dos países asiáticos, não possui tradição no cultivo e no consumo de algas, no entanto, há pequenos produtores de algas vermelhas e alguns cultivos experimentais, além do consumo indireto de algas através do consumo de pratos orientais que vem se popularizando nos últimos anos, como o *Sushi*. A região nordeste produz experimentalmente algas do gênero *Gracilaria* para extração de ágar. A contribuição da produção de algas no Brasil no cenário global é muito incipiente mesmo com condições climáticas diferenciadas para exploração de um vasto número de espécies e sua enorme dimensão costeira (7.491 km). Segundo estimativas da FAO (2019), o registro da produção aquícola em 2016 foi apontado em 730 toneladas. O Chile, que possui uma costa oceânica menor (6.435 km), é o maior produtor da América do Sul, produzindo cerca de 20 mil toneladas de algas, o equivalente a 20 vezes o que o Brasil produziu no período de 2016. Alguns fatores implicam na baixa produção brasileira de macroalgas, como as restrições impostas pela legislação ambiental, o baixo retorno financeiro ao produtor, aos problemas de infraestrutura e o baixo domínio das técnicas de manejo (DENNER, 2018).

2.2 Considerações sobre polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Os carboidratos são moléculas orgânicas formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio. Eles são classificados como monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos a depender do número de carbonos presentes na molécula (NELSON; COX, 2018). Os polissacarídeos são formados por um único tipo de monossacarídeo ou uma combinação de diferentes açúcares. A solubilidade em água é uma característica marcante desse grupo, o que garante uma imensa gama de aplicações industriais, como espessante, gelificante, emulsificante e hidratante (RINAUDO, 2008). As algas marinhas são consideradas uma fonte natural de carboidratos, como também contribuintes majoritários na produção de oxigênio pelo processo de fotossíntese. Elas são um amplo campo de estudo para as ciências naturais, como também um valioso recurso provedor de biomoléculas, tais como polifenóis, carotenoides, pigmentos, enzimas e polissacarídeos (PEREIRA *et al.*, 2014).

Dentre essas biomoléculas as de maior aplicação industrial são os polissacarídeos sulfatados, que estão presentes em grande quantidade em sua parede celular, são exemplos de polissacarídeos sulfatados as carragenanas, agaranas, os alginatos e as fucanas.

Segundo Pereira (2013), as carragenanas apresentam polissacarídeo de cadeia linear, carregado negativamente e é encontrado em algas vermelhas da Família *Rhodophyceae*. A carragenana é conhecida por apresentar as seguintes propriedades: gelificante, estabilizante e espessante.

Já as agaranas são polissacarídeos formados por uma fração neutra cíclica denominada de agarose e uma fração aniônica conhecida como agarpectina. Segundo Canelón *et al* (2014), a agarose é obtida principalmente a partir de algas marinhas das ordens *Gracilariales* e *Gelidiales*. Devido sua alta solubilidade em água quente, seus polissacarídeos são normalmente extraídos a partir do aquecimento da alga (RINAUDO, 2008).

O alginato é um importante polissacarídeo presente na parede celular das algas pardas, ele confere resistência à parede e confere flexibilidade. Os alginatos em sua composição são formados pela combinação do L-guluronato e do D-manuronato, a diferença entre essas frações é o que determina a formação de géis com diferentes forças e flexibilidades. (GACESA, 1988).

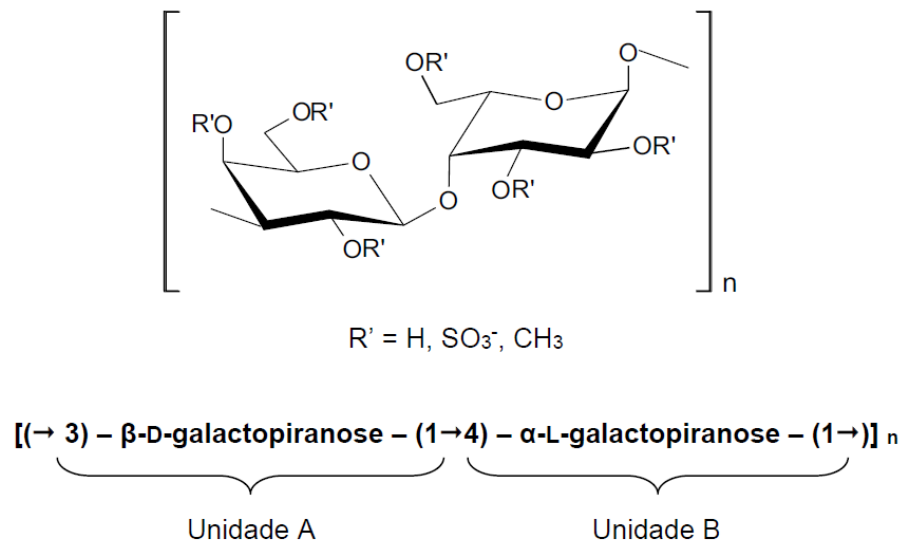
As fucanas são um tipo de polissacarídeo sulfatado negativamente carregado, além de hidrossolúveis e, de uma forma geral, são encontrados na matriz extracelular de algas pardas. Estudos com polissacarídeos sulfatados demonstram diversas atividades, tais como anticoagulante, antioxidante, imunoestimulante, antivenenosa, antiviral, antitumoral, antitrombótica, cardioproteção, proteção da mucosa gástrica e neuroproteção (VASCONCELOS, ARAÚJO, SANTANA; 2015), o que atestam o grande potencial biológico que as algas possuem.

O glicogênio das florídeas, comumente denominado amido das florídeas, é o polissacarídeo de reserva encontrado em todas as algas do filo *Rhodophyta*. Diferencia do amido das plantas superiores devido à ausência da amilose, componente essencial para formação dos grânulos de amido, possui um comprimento total que varia de 9 a 19 resíduos de glicose (PAINTER, 1983).

A parede celular das rodofíceas é estruturalmente formada por dois componentes, um externo rígido, comumente formado por microfibrilas de celulose e outro interno, formado por uma matriz mucilaginosa. A matriz mucilaginosa é constituída por um polímero de polissacarídeos sulfatados. Nas algas vermelhas esse polissacarídeo são as galactanas sulfatadas, também conhecidos como polissacarídeos sulfatados, que podem ser do tipo carragenanas, agaranas ou D/L-híbridas.

Como principal fonte em galactana sulfatada, a alga marinha *Gracilaria birdiae* é tradicionalmente cultivada para exploração do polissacarídeo do tipo agarana. As galactanas sulfatadas do tipo agaranas possuem uma estrutura básica repetitiva, com uma cadeia principal formada por unidades de (1-3)- β -D-galactopiranosose (unidade A) e (1-4)- α -L-galactopiranosose (unidade B) (figura 1), a unidade B normalmente apresenta-se na forma de seu derivado ciclizado 3,6-anidrogalactose (CORDEIRO, 2014; PAINTER, 1983).

Figura 1 - Estrutura química básica das agaranas.



Fonte: Cordeiro (2014)

2.3 Piscicultura no Brasil

Durante a década de 70 duas espécies exóticas foram introduzidas nos reservatórios hídricos da região nordeste do Brasil, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis hornorum*), com o propósito realizar o povoamento da espécie e a piscicultura na região. Das duas espécies introduzidas, apenas a tilápia nilótica obteve êxito econômico. Seguindo o exemplo da região nordeste, na década de 80, a tilápia foi introduzida nos corpos hídricos das hidrelétricas da região sudeste. Nessa região, a tilapicultura ganhou força

como empreendimento comercial, porém alcançou resultados econômicos insatisfatórios devido à falta de preparo técnico e domínio da cadeia produtiva. Na década de 90, a região sul do Brasil registrou um grande aumento na produção de tilápias, isso foi possível graças ao domínio da técnica de inversão sexual, que propiciou o cultivo de sexo único, e o caráter industrial alcançado com o pioneirismo na implantação de frigoríficos exclusivos no processamento de tilápias (SCHULTER, VIEIRA FILHO, 2017).

O consumo de tilápias tornou-se tradicionalmente aceito na região nordeste devido sua entrada nos açudes na década de 70, o que facilitou sua captura e consumo por parte da população menos favorecida economicamente. O consumo em outras regiões do Brasil como as regiões sul e sudeste teve a popularização da tilápia graças à busca pela pesca esportiva nos empreendimentos de pesque-pague. Segundo dados da Associação Brasileira da Piscicultura (2018), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápias com 357 mil toneladas/ano. Os maiores produtores são China (1,8 milhão toneladas/ano), Indonésia (1,1 milhão toneladas/ano) e Egito (800 mil toneladas/ano). Do total de peixes produzidos no país, 51,7% advém da tilapicultura e 43,7% é proveniente da piscicultura de peixes nativos, principalmente o tambaqui, e 4,6% correspondem à produção de outras espécies. Em 2017, o Brasil produziu aproximadamente 691 mil toneladas/ano. A região sul foi a maior produtora de peixes no país com 178 mil toneladas, principalmente o estado do Paraná com 112 mil toneladas. Os principais estados produtores de tilápia são Paraná (105 mil toneladas), São Paulo (66 mil toneladas) e Santa Catarina (32 mil toneladas) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2018).

A produção na piscicultura brasileira ainda está abaixo da sua capacidade real de produção. As questões ambientais, o uso das águas da União e os problemas sazonais, como a seca no Nordeste são alguns dos problemas enfrentados pelos produtores. Em contrapartida, o melhoramento genético, a hibridização, a produção de rações com maior conversão alimentar, a tecnificação da produção aquícola e a implementação de novos sistemas de cultivo são alguns exemplos de técnicas e melhorias que o setor piscícola tem usada para melhorar sua produtividade. Como resultado do uso adequado do conhecimento para produção piscícola, a produção brasileira de 2017 cresceu 8% comparado à produção de 2016, exibindo um resultado satisfatório quando levado em consideração os problemas econômicos que o país se encontra no momento atual (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2018).

2.4 Tilápia-do-Nilo e sua aceitabilidade

O termo Tilápia é a palavra representativa de um grupo formado por gêneros da família *Cichlidae*, como característica do grupo, as tilápias apresentam, principalmente, hábito alimentar onívoro, são eficientes no aproveitamento de alimentos naturais, especialmente o plâncton (SCHROEDER, 1983), são nativas da África, Jordânia e Israel. Há três gêneros reconhecidos: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilápia*, que juntos compõem aproximadamente 112 espécies, porém apenas algumas destas possuem importância comercial na piscicultura, como é o caso da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (LAWRIE, 2005).

Algumas características justificam a presença das tilápias entre as principais espécies cultivadas comercialmente, pode-se destacar: a carne branca, a textura firme, a ausência de espinhos intramusculares, a boa aceitação e seu sabor pouco acentuado; a facilidade de reprodução e fornecimento de alevinos; a facilidade de manipulação hormonal do sexo para cultivo unissexual; a diversidade na dieta; a capacidade de aproveitar alimentos naturais em viveiros; a conversão alimentar satisfatória, compreendendo-se entre 1 a 1,8; o bom crescimento em cultivo intensivo; a grande rusticidade, o que permite resistir ao estresse do manuseio intenso e dos baixos níveis de oxigênio dissolvido no cultivo, além da ampla resistência às doenças; desenvolvem-se em águas com acidez e alcalinidade elevada, crescem e reproduzem-se em uma ampla faixa de salinidade e toleram concentrações elevadas de amônia na água (KUBITZA, KUBITZA, 2000).

O crescimento da produção de tilápia no Brasil se deve por sua grande aceitação de mercado, a oferta constante de produto de alta qualidade, ao domínio da tecnologia de produção em tanques-rede e ao déficit na oferta de pescado no país. Um fator decisivo que ajudou o consumidor adquirir confiança nos produtos da tilapicultura foi sua oferta regular de tilápias inteiras, filés de tilápia e de frescos (KUBITZA, 2013).

2.5 A deterioração do pescado

Segundo o RIISPOA, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, na avaliação dos atributos de frescor do pescado são considerados critérios para avaliar os atributos sensoriais, tais como: superfície do corpo limpa, com relativo brilho

metálico e reflexos multicores próprios da espécie, sem qualquer pigmentação estranha; olhos claros, vivos, brilhantes, luzentes, convexos, transparentes, ocupando toda a cavidade orbital; brânquias ou guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com odor natural, próprio e suave; abdômen com forma normal, firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos; escamas brilhantes, bem aderentes à pele, e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados; carne firme, consistência elástica, da cor própria da espécie; vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas, peritônio aderente à parede da cavidade celomática; ânus fechado; e odor próprio, característico da espécie (BRASIL, 2017).

Segundo Oetterer (1998) e Leitão (1944), a deterioração do pescado se inicia pouco tempo depois da morte e se intensifica com o tempo de exposição e de estocagem do produto, sendo a intensidade das alterações uma manifestação da influência de fatores externos que podem ou não intensificar sua degradação, como a forma de manipulação, a maneira do abate e da forma de conservação, além de fatores internos, como as características físico-químicas do peixe. Os processos de degradação do pescado contam com a ação de enzimas proteolíticas, a oxidação de gorduras e a ação de micro-organismos presentes na pele, guelras e no trato intestinal.

Ainda de acordo com o mesmo regulamento, considera-se que os peixes de maneira geral apresentam um pH em torno de 6,8. Observa-se que o pH final, após captura e abate, está relacionado com a quantidade de glicogênio restante após o abate. Na sequência é possível verificar a diminuição do pH muscular, que é uma consequência da conversão do glicogênio em ácido láctico no processo de glicólise anaeróbica, tendo como consequência a degradação do ATP. O acúmulo de compostos nitrogenados pode ser visto como uma prova da ação degradativa promovida por enzimas produzidas pela microbiota do pescado, sendo os compostos mais frequentes a putrescina, a cadaverina, a trimetilamina, a amônia, etc. Além disso, a concentração de bases voláteis total deve ser de até 30 mg de nitrogênio/100 g para serem considerados frescos (BRASIL, 2017).

No músculo, a oxidação da gordura é causada por compostos químicos ou espécies reativas de oxigênio que causam a quebra das ligações duplas nas frações fosfolipídicas das membranas celulares, que no caso dos peixes são mais suscetíveis porque possuem maior grau de insaturação (RUFF *et al.*, 2004).

2.6 Avaliação da qualidade do pescado

A qualidade final do pescado depende de muitas variáveis, os quais podem ser verificados por meio de ensaios bioquímicos, físico-químicos e microbiológicos.

Quando o pescado é impróprio para o consumo, ele pode ter algumas características visíveis que indicam sua baixa qualidade, como apresentar uma aparência repugnante, a presença de cortes e traumas ao longo do corpo, apresentar odores e sabores desagradáveis, exibir características de águas poluídas ou mostrar sinais clássicos de má conservação. Quando o pescado apresentar algumas dessas características, ele já comprometeu os limites microbiológicos e físico-químicos fixados pela legislação, podendo ser descartados (BRASIL, 2007).

Todos os tipos de produtos de pescado precisam estar com sua microbiota dentro dos limites impostos pela legislação. Os microrganismos sobre os quais a legislação estabelece limites são aqueles que quase sempre não alteram a aparência do pescado, sendo as limitações decorrentes do fato de serem patogênicos para o homem e não somente deteriorantes do alimento. Pela agilidade, os testes sensoriais são mais empregados nas indústrias de pescado do que os microbiológicos e físico-químicos, porém este teste não exclui os demais, devendo-se unir pelos menos dois desses testes para obter uma avaliação mais precisa e confiável (VIEIRA *et al.*, 2004). No Brasil, a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, define os critérios microbiológicos para alimentos expostos à venda e à exportação. Os itens 7, 20 e 22 da citada resolução, abordam o pescado e os produtos derivados da pesca e os limites microbiológicos para sua comercialização (BRASIL, 2001).

Nos testes físico-químicos o limite aceitável para bases voláteis totais (BVT) é de 30mg de N/100g de pescado; como este valor aumenta com a deterioração do pescado, caracteriza-se como produto impróprio para o consumo aquele que ultrapassar esse limite (BRASIL, 2017). Uma consequência desse aumento é observada na evolução do pH de menos ácido para mais básico no decorrer do processo de liberação das bases voláteis. O pH menor que 7,00 quase sempre vai indicar um pescado com ótima qualidade para consumo, sendo válido, principalmente, para os peixes.

2.7 Composição química do pescado

A composição química ou centesimal do pescado é muito diversificada e está diretamente ligada a influência do local em que vivem e dos fatores intrínsecos de cada espécie, tais como fatores genéticos, morfológicos e fisiológicos. Quando se estuda a composição centesimal dos peixes de maneira geral, refere-se a sua composição quanto ao teor de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos, sendo o percentual do último uma consequência dos parâmetros já estabelecidos (OGAWA, MAIA, 1999).

Segundo Gonçalves (2017) a água é a grande porção encontrada no pescado, tanto em peso como em volume, ela tem influência nos atributos sensoriais, na qualidade e na vida de prateleira. Segundo Ogawa e Maia (1999) o músculo do pescado pode conter de 60 a 85% de umidade, cerca de 20% de proteína, de 1 a 2% de cinza, de 0,3 a 1,0% de carboidrato e de 0,6 a 36% de lipídios. Os lipídios apresentam uma maior variação em função do tipo de músculo corporal numa mesma espécie, sexo, idade, época do ano, habitat e dieta entre outros fatores. Os peixes podem ser classificados segundo sua composição química, como peixes gordos, 68,6% de umidade, 20,0% de proteínas, 10,0% de lipídeos e 1,4% de cinzas; peixes semi-gordos, 77,2% de umidade, 19,0% de proteínas, 2,5% de lipídeos e 1,3% de cinzas; peixes magros: 81,8% de umidade, 16,4% de proteínas, 0,5% de lipídeos e 1,3% de cinzas (JACQUOT, 1961). Com relação aos minerais, a carne de pescado é considerada uma fonte de cálcio e fósforo, apresentando também quantidades razoáveis de sódio, potássio, manganês, cobre, cobalto, zinco, ferro e iodo (CONTRERAS-GUZMÁN, 1999).

2.8 O aproveitamento de resíduos do processamento de pescado

Numa perspectiva de aproveitamento dos resíduos, a indústria de processamento do pescado deve dispor de alternativas para o gerenciamento dos mesmos que são produzidos, implicando no diferencial das empresas, e assim estimular a diversificação de produtos, o crescimento sustentável e a responsabilidade socioambiental (PESSATTI, 2001).

Com uma composição balanceada em aminoácidos, particularmente aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (Neves *et al.*, 2004), as proteínas musculares do peixe possuem elevado valor nutricional. O destino dos resíduos sólidos do beneficiamento do pescado ocorre, principalmente, para alimentação animal na forma de

rações, mas também podem ser aproveitados para a produção de fertilizantes (SEIBEL; SOARES, 2003), iscas para pesca artesanal ou artesanatos (Banco do Nordeste, 1999). O uso de tecnologias para aproveitamento de resíduos, como a máquina desossadeira, aumenta a capacidade da indústria pesqueira em responder, não só à demanda por produtos diferenciados, mas também à tendência da busca por alimentos saudáveis e com alto valor nutritivo (JORGE, 1997; MIRANDA *et al.*, 2003). O valor nutricional desses resíduos, ricos em proteínas e em ácidos graxos ômega-3, incentiva o desenvolvimento de produtos para a alimentação humana, podendo suprir as necessidades nutricionais de proteínas dos setores mais carentes da sociedade por um preço mais acessível (FELTES *et al.*, 2010).

O pescado pode ser submetido a diversas linhas de processamento na indústria, permitindo uma ampla gama de produtos. Uma das atividades da indústria pesqueira mais geradora de resíduos é a filetagem de peixes. A obtenção do filé de peixe depende da habilidade manual do operário, das máquinas filetadoras, da forma do corpo, do tamanho da cabeça e do peso das vísceras, pele e nadadeiras (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). Depois do processo de filetagem, uma quantidade considerável de carne ainda fica retida no esqueleto do peixe. Esta carne quando obtida através de máquina apropriada, pode ser utilizada na produção de outros produtos de maior valor agregado. A recuperação da carne aderida pode chegar a 60% do material que passa através da máquina (FREITAS *et al.*, 2012).

No processamento da tilápia, há a geração de grande quantidade de resíduos ou subprodutos, que apresentam ácidos graxos poli-insaturados essenciais e proteína de elevado valor biológico, vitaminas e minerais (DRAGNES *et al.*, 2009). Esses resíduos podem ser convertidos em produtos comerciais ou matéria-prima para produtos secundários, através de tecnologias adequadas. Segundo Pires (2014), a utilização desse material constitui-se em uma alternativa promissora na elaboração de produtos alimentícios de excelente qualidade nutricional, que pode contribuir para a diminuição de problemas de má nutrição, atribuídos à carência ou deficiência de proteínas de elevado valor nutricionais na dieta alimentar, além de reduzir os impactos negativos da atividade industrial ao meio ambiente.

2.9 Carne mecanicamente separada (CMS)

Os resíduos de filetagem de peixes são aproveitados mundialmente através de máquinas separadoras de carnes e ossos. A tecnologia que permitiu tal feito, *Minced Fish Technology*, surgiu no Japão no final da década de 1940 como reflexo da necessidade de aproveitar o alto descarte de carnes e a grande demanda de mercado pela polpa de peixes (FIELD, 1988). A polpa obtida por máquina desossadeira é denominada de CMS. A polpa quando obtida, aumenta o rendimento total do peixe, diminuindo o desperdício. A CMS obtida é isenta de vísceras, escamas, ossos e peles. Quando os peixes são filetados, um adicional de 8 a 12% de carne pode ser separado dos resíduos de filetagem. Alguns peixes como arenque e a cavala deixam resíduos de ossos nos filés mesmo após passarem por filetagem, o que pode diminuir sua aceitabilidade, com a produção do *minced* dessas espécies pode-se evitar a presença desses ossos e ampliar sua aceitação. A trituração, por meio da técnica da CMS, possui a vantagem do controle sobre o sabor, aparência e qualidade pela incorporação de aditivos. O *minced* de peixes gordo requer proteção contra a oxidação no armazenamento a frio (KEAY, 1979). A rancificação das gorduras pode ser contornada através de aditivos pela mistura de antioxidantes. O *minced* de espécies de baixo valor comercial pode ser explorado economicamente através dessa tecnologia na agregação de valor. A CMS pode ser moldada de diferentes formas, além de ser utilizado em métodos de produção contínua (GONÇALVES, 2011).

O mercado atual de CMS é pequeno em comparação com a quantidade de carne moída que poderia ser disponibilizado por todas as espécies adequadas. A CMS estraga muito mais rápido do que os filés do mesmo peixe, principalmente porque a estrutura da carne é destruída durante a separação. Existe a necessidade de um cuidado extra que deveria ser tomado para manter a boa qualidade da CMS, em particular, o peixe usado para elaborar o *minced* deve ser inicialmente de qualidade alta e o processamento deve ser concluído rapidamente para evitar alterações sensoriais no produto. A CMS deve ser congelada assim que for produzida, ou incorporada em produtos para assim depois ser congelada dentro de 4 a 5 horas, em todo o processo ela deve ser mantida resfriada enquanto aguarda o congelamento. Quando lavada com água clorada (5 ppm) mantém-se melhor que a CMS não lavada (KIRSCHNIK *et al*, 2013).

A partir da CMS, pode-se produzir uma infinidade de produtos, como *fishburger*, tirinhas empanadas, *nuggets*, salsichas, linguças, recheios para massas e o *surimi* (GONÇALVES, 2011). A produção de CMS ainda não é significativa no Brasil, mas como matéria prima ela dispõe de inúmeros produtos como já citados, o que deve ser levado em consideração para se estabelecer um mercado forte e inovador no País, pois além da inovação de produtos, a CMS de pescado conta com o aumento do consumo de produtos funcionais (OLIVEIRA, 2008).

2.10 Estabilidade da CMS sob congelamento

O armazenamento adequado de peixes refrigerado e seus subprodutos prolonga consideravelmente sua vida de prateleira, porém não traz melhoras no aspecto qualitativo, devendo sempre atentar para as condições de higiene, temperatura e tempo ao manipular e armazenar o pescado. Sabe-se que mesmo em temperaturas muito baixas as reações que envolvem a rancificação de gorduras, o que ocasiona cheiro e odor desagradável de ranço, e a degradação autolítica de proteínas, o que facilita a proliferação de bactérias e perda da firmeza do músculo, continuam a ocorrendo durante o armazenamento congelado. Com a incorporação de aditivos químicos, como antioxidantes e crioprotetores, as condições de estabilidade da CMS frente às alterações físico-químicas são favorecidas, permitindo o armazenamento prolongado com maior qualidade. A indústria de beneficiamento de pescado tem utilizado compostos químicos sintéticos como o *hidroxitolueno butilado* (BHT) e o *butylated hydroxyanisole* (BHA) como agentes antioxidantes na CMS de pescado, porém foi demonstrado que tanto o BHT como o BHA podem ocasionar alterações mutagênicas nas células (CHEN; PEARSON; GRAY, 1992), sendo seus limites de aplicação limitados por legislação (BRASIL, 1998).

2.11 Alternativa aos antioxidantes comerciais utilizados em pescado

A oxidação no pescado afeta sua qualidade e aceitação, pois afeta características como sabor, cor, textura e valor nutricional. Em produtos cárneos, os antioxidantes são utilizados com o intuito de combater a oxidação e preservar seus atributos sensoriais. Entre eles, ácido ascórbico, *hidroxitolueno butilado* (BHT), *butylated hydroxyanisol* (BHA), nitritos e nitratos são

comumente utilizados. O uso desses aditivos é regulamentado por lei, pois o consumo acima do limite estabelecido pode implicar em problemas à saúde de quem consome e seu uso indiscriminado pode influenciar nos atributos sensoriais do produto. Em produtos industrializados, por legislação, o limite permitido para adição do BHT e do BHA como antioxidante é de 0,01g /100g do produto, para o ácido ascórbico que é utilizado comumente na forma sintética, não há limite estabelecido, sendo permitido o uso suficiente para obter tal efeito, já os nitritos e nitratos possuem limites variados entre 0,01 a 0,03g/100g, apenas para uso como conservantes (BRASIL, 1998).

O fácil acesso a alimentos industrializados, especialmente alimentos processados, contribuíram para a transição epidemiológica e nutricional observada nas últimas décadas no Brasil e no mundo, caracterizados pelo aumento significativo da ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares (infarto, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial), metabólicas (diabetes mellitus, obesidade) e neoplasias. Por outro lado, uma melhor compreensão dos mecanismos que desencadeiam essas doenças e sua associação com os hábitos alimentares, bem como o maior acesso da população a essas informações, permitiu o surgimento de um nicho de mercado que busca por alimentos mais naturais e saudáveis (RIBEIRO *et al*, 2018).

As algas marinhas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, que são gorduras facilmente oxidáveis, no entanto, para evitar a oxidação desses compostos, as algas desenvolveram uma rápida resposta ao estresse oxidativo por meio da síntese de metabólitos antioxidantes como os polissacarídeos sulfatados presentes na parede celular. Como alternativa aos antioxidantes sintéticos aplicados em produtos cárneos, os polissacarídeos sulfatados presentes em algas, podem ser uma fonte promissora desse recurso, pois apresentam estabilidade no armazenamento frente aos antioxidantes sintéticos e não modificam atributos organolépticos (SANTOS RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da alga marinha

Exemplares da alga marinha vermelha *G. birdiae* E.M. Plastino & E.C. Oliveira foram obtidas a partir das estruturas experimentais de cultivo, localizados na zona costeira de Fleixeiras, município de Trairi – CE. Em seguida, conduzidas ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), em sacos plásticos, e congeladas a -20°C. No laboratório de Processamento do Pescado (LAPROP), a matéria-prima foi limpa para a retirada de epífitas e/ou outros organismos incrustantes, lavada em água corrente, desidratada em temperatura ambiente (25°C) e armazenada em recipientes até o uso (figura 2).

Figura 2 - Alga marinha *Gracilaria birdiae*.



Fonte: BIOTA/FAPESP (2014)

Segundo o banco de dados internacional AlgaeBase (2019), a *Gracilaria birdiae* possui a seguinte classificação taxonômica:

Empire: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gênero: *Gracilaria*

Espécie: *Gracilaria birdiae* E.M. Plastino & E.C. Oliveira.

3.2 Extração do polissacarídeo sulfatado Total (PST)

Para extração do PST da alga foi utilizado o método de extração aquosa refinada (EAqRef) (ARAÚJO *et al.* 2012).

A alga seca e triturada foi submetida à extração refinada a partir de 5 g de tecido algal, na concentração de 1,5% (m/v), em temperatura ambiente (25°C) por 12 horas sob agitação constante para redução de pigmentos e elementos não formadores de gel. Após filtração em tecido de náilon, os resíduos foram submetidos a uma re-extração a 80°C por 4 h, sob agitação constante. Após filtração nas mesmas condições, o resíduo foi descartado, enquanto que os carboidratos presentes no sobrenadante foram precipitados com álcool comercial (1:3, v/v) por 24 horas sob refrigeração. Após esse período, o material precipitado foi dialisado e liofilizado para obtenção do polissacarídeo sulfatado total (PST) e o rendimento (n=3) foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

Onde: m_1 – massa inicial do tecido algal;

m_2 – massa final, após extração a 80°C.

3.3 Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados

3.3.1 Determinação do conteúdo de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e monitorados em espectrofotômetro, ajustado à 490 nm. O açúcar simples D-galactose foi utilizado para a obtenção da curva-padrão.

3.3.2 Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes

As concentrações de proteínas contaminantes foram realizadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão e monitoradas em espectrofotômetro à 525 nm.

3.3.3 Determinação do conteúdo de sulfato

O teor de sulfato foi determinado após hidrólise ácida (HCl 1 M, 5 horas, 105°C) pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962) e monitorado em espectrofotômetro à 360 nm. O sulfato de sódio foi empregado como padrão.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

O PST (25 µg) foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 50 mM (pH 9,0), utilizando os glicosaminoglicanos condroitim sulfato, dermatan sulfato e heparina como padrões, os quais são polissacarídeos de animais, mas foram utilizados devido à ausência de padrões para algas. Os polissacarídeos foram aplicados no gel e a corrida realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o procedimento, o PST presente no gel foi fixado com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio a 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% e, finalmente,

descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v⁻¹v⁻¹v⁻¹) (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

3.5 Análise da atividade antioxidante *in vitro*

3.5.1 Inibição do radical livre 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

O sequestro do radical livre DPPH foi realizado segundo a metodologia descrita por Blois (1958) com modificações. Sequencialmente foram preparadas as diluições das amostras para cada extração nas concentrações entre 4 e 0,125 mg/ml de PST. Retirou-se em cada diluição uma alíquota de 300 µL que foi diluída e agitada em 200 µL de metanol (MeOH). Nessa solução foi adicionada 2,5 mL de DPPH (75 µL em MeOH), permanecendo por 30 min no escuro. As leituras de absorbância foram realizadas a 517 nm. A inibição do radical DPPH foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Inibição do Radical DPPH (\%)} = \frac{(A_o - (A - A_b))}{A_o} \times 100$$

Onde: A_o – absorbância do DPPH sem amostra.

A – absorbância da amostra com DPPH

A_b – absorbância da amostra sem DPPH

3.5.2 Análise de quelação do íon-ferroso

A análise da propriedade quelante foi realizada de acordo com o método descrito por Chew *et al.* (2008) com modificações. Em triplicata, adicionou-se, nesta ordem, 1 mL de sulfato ferroso 0,1 mM (FeSO₄), 1 mL de amostra (PST 0,1 – 4 mg/mL) e 1 mL de ferrozina 0,25 mM (ácido 3-(2-peridil) -5,6-difenil-1,2,4-triazina-p, p'-dissulfônico) em tubos de ensaio. Em seguida, os tubos foram agitados por 1 min, mantendo repouso por 10 min, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro a 562 nm. O branco foi obtido substituindo a amostra por água destilada. O

ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) foi utilizado como referência. A habilidade de quelação do íon ferroso foi calculada em porcentagem pela seguinte fórmula:

$$\text{Habilidade de quelação do íon ferroso (\%)} = \frac{[A_o - (A - A_b)]}{A_o} \times 100$$

Onde: A_o – absorbância do FeSO_4 e ferrosina sem amostra;

A – absorbância da amostra, FeSO_4 e ferrosina;

A_b – absorbância da amostra sem FeSO_4 e ferrosina.

3.6 Adição do PST à CMS de tilápia e avaliação dos parâmetros de controle de qualidade durante a estocagem sob congelamento

3.6.1 Obtenção da Carne Mecanicamente Separada (CMS)

Para obtenção da CMS, foram utilizados resíduos da filetagem de tilápia nilótica (carcaças e aparas do toalete do filé), provenientes da indústria de processamento deste peixe. ForaO processo de obtenção foi realizado na planta de processamento de uma indústria, no município de Fortaleza-CE, sob condições higiênicas satisfatórias. Para a recuperação da carne utilizou-se uma máquina despulpadora de pescado. As amostras foram embaladas em porções menores em sacos de polietileno, vedadas e congeladas (-22°C). A CMS foi transportada em caixas isotérmicas para o Laboratório de Processamento do Pescado do Departamento de Engenharia de Pesca (UFC) para a realização desta pesquisa.

*3.6.2 Tratamento da CMS de tilápia com PST da rodófitca *G. birdiae**

As amostras de CMS foram divididas em cinco grupos para tratamento como descrito a seguir: três tratamentos com o PST da alga *G. birdiae* em diferentes concentrações (0,01; 0,02 ou 0,03 g de PST/100g de CMS). Um tratamento como controle negativo foi preparado nas mesmas condições sem adição do PST da alga. Como controle positivo foi utilizado o BHT na concentração de 0,01 g/100g, de acordo com a Portaria da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA) de Nº 1004, de 11 de dezembro de 1998 (BRASIL, 1998), sendo todas as amostras embaladas em sacos de polietileno, vedadas, congeladas e estocadas a -22°C . Os tratamentos foram divididos em pequenas porções, sempre em triplicata, para cada análise que foi realizada durante os dias estabelecidos. As determinações de composição química foram realizadas no início (0 dias) e no final (180 dias) de armazenamento. Já os parâmetros físico-químicos e a contagem de microrganismos psicrotróficos foram realizadas no dia do processamento (0 dia) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento. Além disso, no início da estocagem foram enviadas amostras para análise microbiológica das bactérias da legislação, citada na Resolução RDC 12 nº 12 (BRASIL, 2001), *Salmonella* sp., estafilococos coagulase positiva e coliformes à 45°C .

3.7 Composição química da CMS de tilápia-do-Nilo

3.7.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, onde as amostras permaneceram em estufa de secagem na temperatura $105\pm 1^{\circ}\text{C}$ até peso constante (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985). Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g/100g.

3.7.2 Proteína bruta

A proteína bruta foi quantificada mediante a determinação de nitrogênio total pelo método de Microkjeldhal, utilizando o fator 6,25 para conversão do valor de nitrogênio em proteína (JOHNSON; ULRICH, 1974). Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g/100g.

3.7.3 Lipídios totais

O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando acetona P.A como solvente extrator (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985). Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g/100g.

3.7.4 Cinzas

A fração cinza foi determinada por incineração da matéria orgânica, em forno mufla a 550°C, até o peso constante (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985). Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g/100g.

3.8 Avaliação dos parâmetros físico-químicos

3.8.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

A mensuração do pH foi realizada através do pHmetro digital, sendo utilizada 5 g de amostra em 50 mL de água destilada, conforme Pregmolato e Pregmolato (1985).

3.8.2 Bases nitrogenadas voláteis totais (N-BVT)

As análises de bases nitrogenadas voláteis totais (N-BVT) foram efetuadas segundo Malle e Tao (1987) a partir do método de destilação com modificações. Foram homogeneizadas 10 g das amostras com 90 mL de ácido tricloroacético para precipitação do nitrogênio total. O filtrado, contendo o nitrogênio volátil, foi alcalinizado a vapor, sendo recebido em solução de ácido bórico e titulado com solução de ácido sulfúrico 0,05 M, padronizado na presença de indicador misto. O cálculo do teor de N-BVT foi realizado através da seguinte fórmula:

$$N - BVT = \frac{14 \left(\frac{g}{mol}\right) \times a \times b \times 300}{25 \text{ mL}}$$

Onde:

a – ml de H₂SO₄ utilizado na titulação;

b – normalidade do ácido sulfúrico.

3.8.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

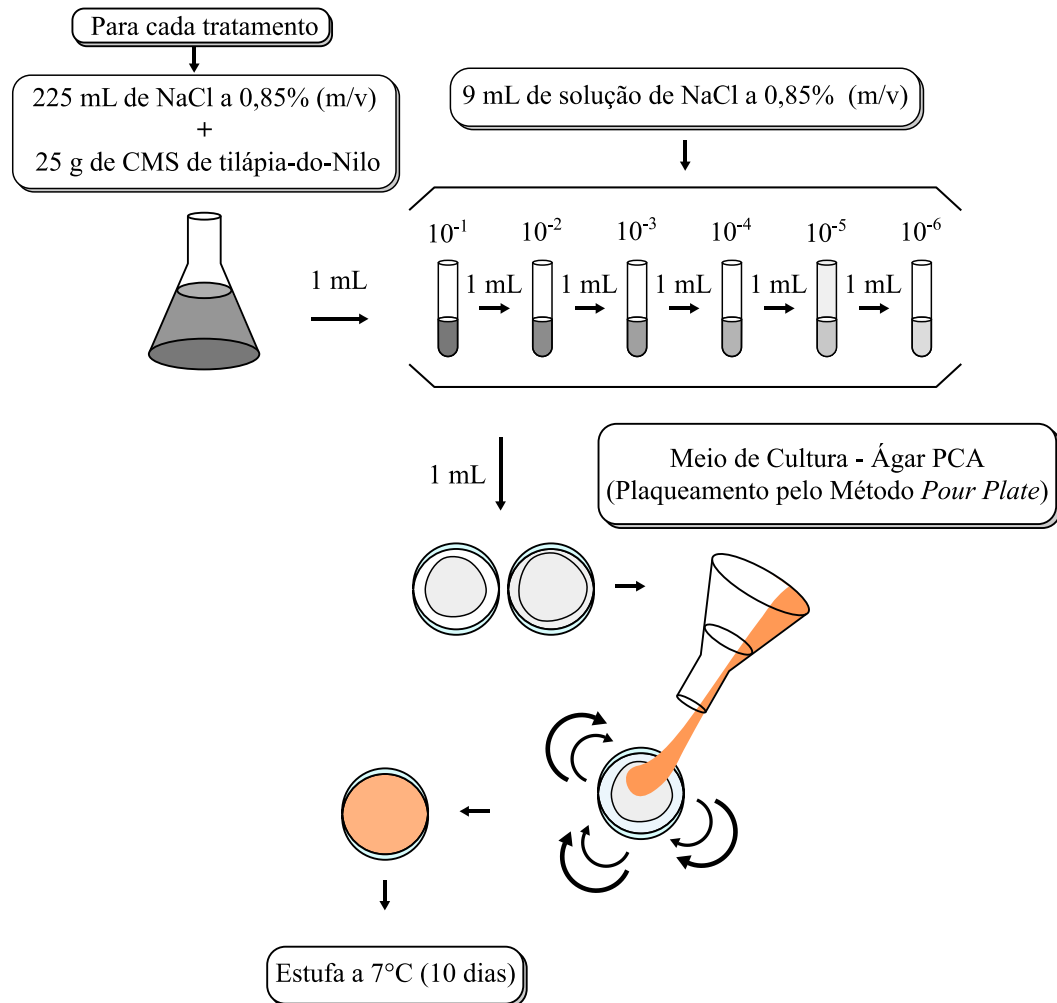
O teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, indicador de peroxidação lipídica, foi avaliado pelo método de extração em ácido tricloroacético (TCA), conforme Vyncke (1970), utilizando o tetrametoxipropano para a obtenção da equação da reta que foi utilizada no cálculo dos valores de TBARS.

Para a extração dos aldeídos preparou-se um extrato ácido aquoso homogeneizado com 10 g das amostras e 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) diluído em propil galato (PG) e um agente quelante, o EDTA sódico, com a finalidade de evitar a formação errônea de malonaldeído ou outras substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) durante a mistura e filtração da amostra. Esse extrato filtrado reagiu com a solução de TBA sob aquecimento por 15 min, em banho-maria, para a formação do complexo colorido, o qual foi medido em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em valor de TBARS, definido como miligramas (mg) de malonaldeído por quilograma (kg) de amostra.

3.9 Análise microbiológica

As análises das bactérias contempladas pela legislação brasileira vigente foram realizadas pela pesquisa de *Salmonella* sp/25g., quantificação de *Estafilococos* coagulase positiva/g e enumeração de coliformes a 45 °C/g de acordo com as recomendações da Resolução RDC/ANVISA nº12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) no tempo inicial de estocagem. Essa análise foi realizada pelo laboratório LABORSAÚDE – Serviços de Análise e Comércio LTDA. Os microrganismos aeróbios psicrotóxicos foram quantificados pelo método de plaqueamento, utilizando o meio ágar para contagem padrão, sendo as placas incubadas em estufa BOD por 10 dias (DOWNES; ITO, 2001), além de avaliados a cada 30 dias durante 180 dias de estocagem. As colônias foram quantificadas e os resultados expressos em UFC/g (figura 3).

Figura 3 - Determinação de microrganismos psicrotróficos pelo método de plaqueamento.



Fonte: autor.

3.10 Análise estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média e desvio-padrão ($\bar{x} \pm DP$) e comparados por análise de variância univariada (ANOVA) entre três ou mais tratamentos e teste de *t*-Student foi utilizado para comparação entre dois tratamentos, considerando o nível de significância de 5%. Foi utilizado o software OriginPro 2018 para a análise dos dados e as representações gráficas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e composição química do PST da alga marinha vermelha *G. birdiae*

O rendimento obtido de PST da macroalga *G. birdiae* foi de 36,81±16,01% a partir da matéria-prima desidratada e procedimento de liofilização. Na composição química, obtiveram-se os teores de 77,39% para açúcares totais, 3,00% para sulfato livre e ausência de proteínas contaminantes (tabela 1).

Souza *et al.* (2012) obtiveram um rendimento de 27,2% de PST da alga marinha vermelha *G. birdiae* utilizando extração aquosa refinada (25 °C, 15h; 90 °C, 45min; 1,5% m/v). Ao estudar o efeito da sazonalidade no rendimento dos PSTs da *G. birdiae*, Pereira (2009) obteve um rendimento médio de 56,5% para extração aquosa não refinada (100 °C, 4h; 0,5% m/v). Na literatura é descrito que o rendimento dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é variável com o protocolo de obtenção, espécie utilizada e estação do ano (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003; SOUZA *et al.* 2012). A temperatura é um dos fatores responsáveis pelo rendimento de PST na extração (SOUZA *et al.* 2012), principalmente quando é utilizado o método de extração aquosa. Vanderlei *et al.* (2011) avaliaram os teores de açúcares totais (68,2%) e sulfato livre (8,38%) do PST de *G. birdiae* obtidos pelo método de extração enzimática, utilizando a papaína (60°C; 6h). Pereira (2009) obteve uma média de 1,35% no teor de sulfato e de 0,5% no conteúdo médio de proteínas para *G. birdiae*. Neste estudo, não houve arrasto de proteínas como também verificado em outros trabalhos com algas marinhas vermelhas com outros protocolos de obtenção (COURA *et al.* 2012; RODRIGUES *et al.* 2010a; 2010b; VANDERLEI *et al.* 2011).

Tabela 1- Rendimento e composição química (%) dos PSTs da alga marinha *Gracilaria birdiae*.

| Extração | Rendimento ¹ | Açúcares totais | Sulfato livre | Conteúdo protéico ² |
|----------|-------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|
| PSTs (%) | 36,81 ± 16,01 | 77,39 | 3,00 | - |

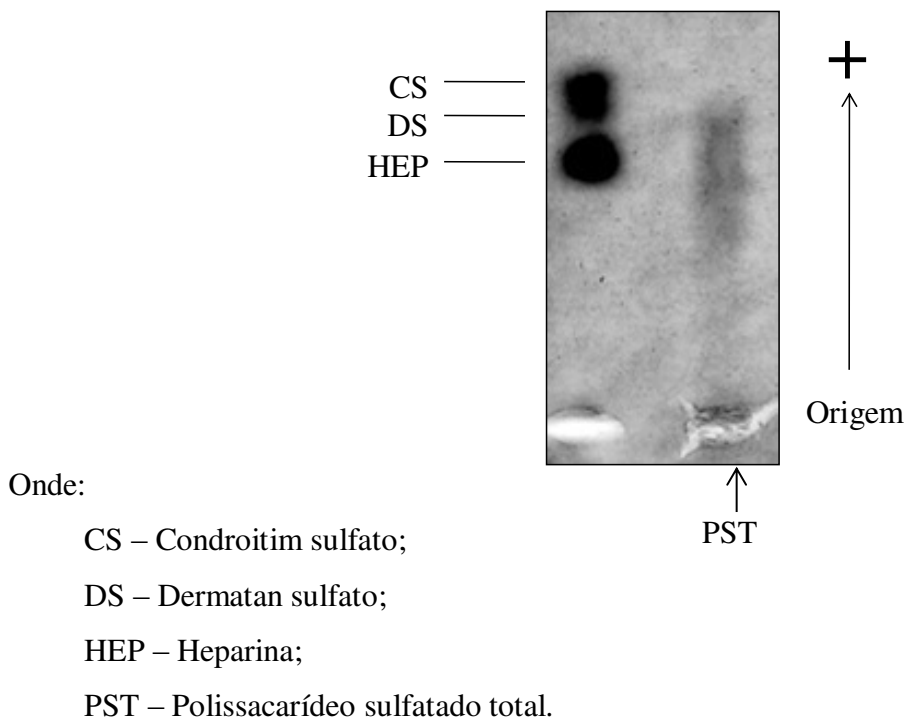
¹Dados expressos com média ± desvio padrão. ² não foi detectada a presença significativa de proteínas.

4.2 Eletroforese em gel de agarose

O ensaio de eletroforese em gel de agarose do PST da *G. birdiae*, revelou única banda polidispersa co-migrando como heparina e dermatan sulfato, porém distinto que o condroitim sulfato (figura 4), sendo o padrão violáceo observado uma indicação da presença de polissacarídeos sulfatados (MELO, 2012).

Os resultados da eletroforese corroboram com os resultados encontrados por Araújo *et al.* (2011) e Rodrigues *et al.* (2011) que estudando outras espécies de algas vermelhas observaram também polissacarídeos com uma única banda polidispersa. Vanderlei *et al.* (2011) em estudos de obtenção de PS da alga marinha vermelha *G. birdiae*, obtidos por extração enzimática, seguida de fracionamento por cromatografia de troca iônica (DEAE - celulose), observaram a existência de uma única banda polidispersa para as frações polissacarídicas obtidas, confirmando as características de banda polidispersa observada neste estudo.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose (0,5%) do PST da *Gracilaria birdiae*.



4.3 Atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria birdiae*

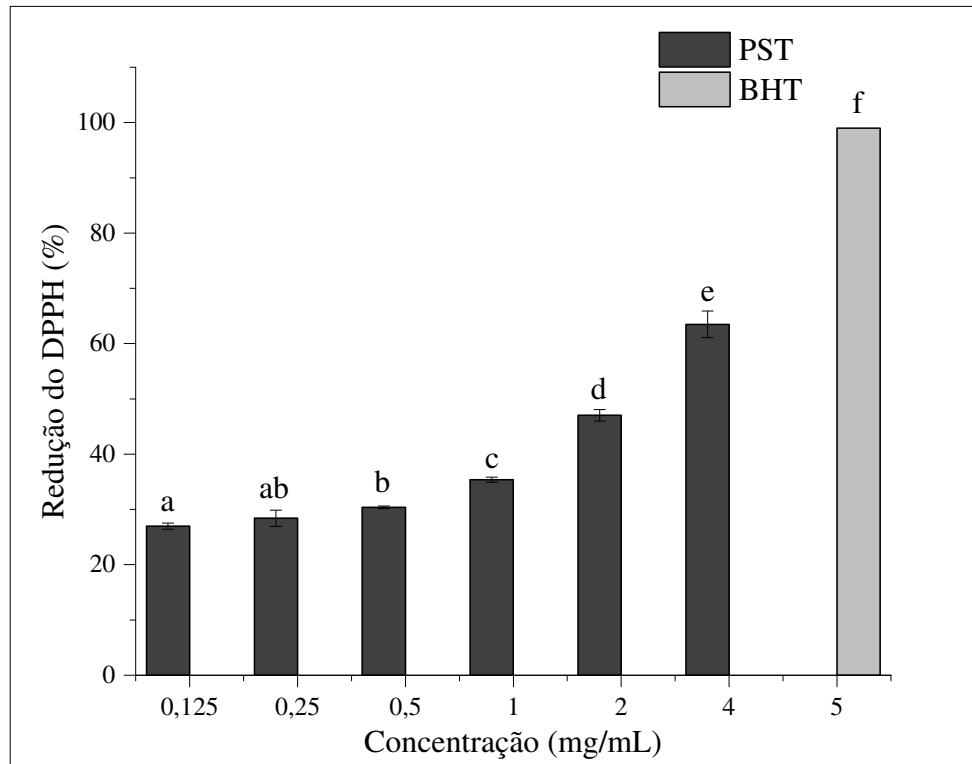
4.3.1 Ensaio de redução do radical livre DPPH

O potencial redutor do radical livre DPPH do PST da *G. birdiae* mostrou dependente diretamente de concentração (0,125 – 4 mg/mL), exibindo como melhor redução o valor de $66,93 \pm 6,20\%$ (4 mg/mL). Em todas as concentrações testadas, observaram-se reduções inferiores a ação do antioxidante *hidroxitolueno butilado* (BHT) ($p < 0,05$), frente ao controle positivo, que foi de 99% (5 mg/mL) (gráfico 1).

A máxima metade do índice de concentração (IC_{50}), que implica numa concentração que reduza 50% do agente oxidante, obtida neste estudo foi de 2,35 mg/mL de PST da *G. birdiae*.

Souza *et al.* (2011), ao trabalharem com extratos etanólicos e metanólicos (4h, 20°C; 6h, 40°C; 10% m/v) das algas vermelhas *G. birdiae* e *G. cornea*, obtiveram reduções do radical DPPH dependes de concentração, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, porém apresentando um melhor IC_{50} para os extratos obtidos, com os valores de IC_{50} de 0,77 e 0,76 mg/mL para os extratos etanólicos e de 0,86 e 0,76 mg/mL para os extratos metanólicos, respectivamente. Em outro estudo, Souza *et al.* (2012) encontraram para extração aquosa refinada resultados próximos ao deste estudo ao trabalharem com PST de *G. birdiae*, obtendo um IC_{50} de 1,62 mg/mL na redução do radical DPPH, além de exibir reduções do DPPH dependentes de concentração.

Gráfico 1 – Redução do radical livre DPPH em diferentes concentrações do PST obtido da rodofícea *G. birdiae*.



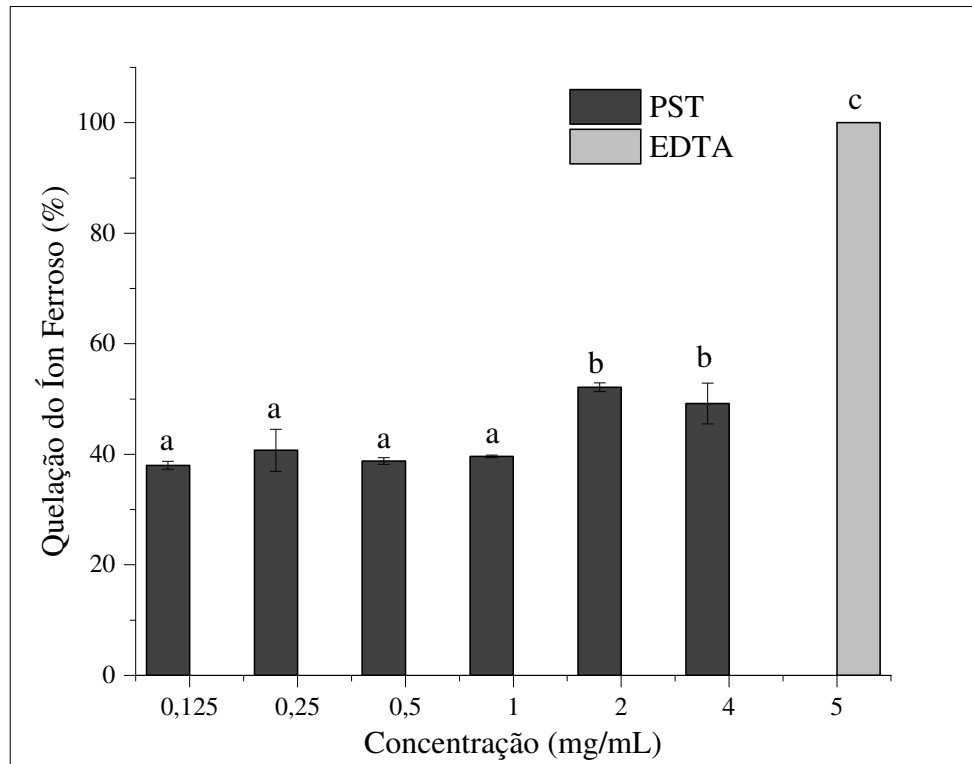
4.3.2 Ensaio de quelação do íon-ferroso

O efeito quelante de inibição do íon ferroso do PST de *G. birdiae* resultou em valor ótimo de concentração com maior atividade inibitória do íon-ferroso de $52,13 \pm 0,81\%$ (2 mg/mL), porém exibiu atividade quelante inferior a ação inibitória do ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) ($p < 0,05$), tomado como controle positivo, que foi de 100% (5 mg/mL) (gráfico 2). Para o PST extraídos neste estudo o IC_{50} foi de 3,44 mg/mL.

Alencar (2016) obteve uma inibição de 69,8 % do íon-ferroso numa concentração de 4 mg/mL dos polissacarídeos da *Gracilaria caudata*, enquanto Sousa (2015) obteve na mesma concentração uma habilidade quelante de 39% para o PST da alga vermelha *Solieria filiformis*, ambos extraídos por extração enzimática. Sousa (2015) obteve um IC_{50} 0,86 mg/ mL ao trabalhar com polissacarídeos da *S. filiformis* obtidos por extração enzimática. Em um estudo com polissacarídeos da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, a partir de extratos metanólicos, foi

obtido um IC₅₀ de 3,08 mg/mL com um índice de inibição do íon-ferroso de $67,0 \pm 0,93\%$ (5 mg/mL) (KUMAR, GANESAN; RAO, 2008).

Gráfico 2 – Ensaio de quelação do íon ferroso em diferentes concentrações de PST.



A comparação dos dois métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante do PST da alga vermelha *G. birdiae*, revelou uma maior capacidade reduzir o radical livre DPPH do que a habilidade de quelar o íon-ferroso.

4.4 Análises químicas, físico-químicas e microbiológicas

4.4.1 Composição centesimal

A composição química da CMS de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) quanto aos parâmetros umidade, proteínas, lipídios e cinzas no início e término de 180 dias sob congelamento (-22°C) está apresentada abaixo em resumo (tabela 2). A umidade apresentada

pelos tratamentos ao longo do experimento decresceu em relação ao início do experimento ($p < 0,05$) com exceção do PST 0,01 g/100g ($p > 0,05$). A umidade variou a partir do valor mínimo de 71,72% ao valor máximo de 77,30%. A diminuição observada da umidade pode ser explicada pela desidratação que ocorre durante o armazenamento prolongado (KIRSCHNIK *et al*, 2013). A maior umidade no tratamento controle deve-se a natureza hidrofílica dos polissacarídeos (NELSON; COX, 2018). O percentual de proteínas não diferiu ao longo do tempo de estocagem ($p < 0,05$) com exceção do tratamento controle ($p > 0,05$). O valor proteico observado variou de 12,64% a 15,25%. A determinação do percentual lipídico, obtido para cada tratamento, exibiu um aumento do conteúdo lipídico, mas somente foi significativo para os PST 0,01 g/100g, PST 0,02 g/100g e PST 0,03 g/100g ($p < 0,05$). O limite de variação lipídica foi de 10,66% a 14,02%. A diferença observada nos lipídios pode ser explicada pelo tipo de musculatura aproveitado no processo de fabricação da CMS que dependendo de qual parte do músculo foi utilizado, apresenta diferentes percentuais de lipídios (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). O conteúdo de cinzas obtidos no término dos 180 dias foi maior do que no início do experimento ($p < 0,05$), porém esse aumento não foi significativo para o controle positivo ($p > 0,05$). A variação encontrada para cinzas é de 0,47% a 0,74%.

Oliveira *et al* (2008), ao trabalharem com filés de tilápia-do-Nilo, obtiveram para *Oreochromis niloticus* armazenada sob refrigeração um média percentual de umidade próximo ao valor máximo obtido, variando de 77,16% a 78,24%. Já para proteínas, lipídios e cinzas, obtiveram uma variação de 18,71% a 19,73%, de 1,33% a 3,19% e 0,17% a 0,20%, respectivamente. Estes valores diferiram dos encontrados neste trabalho. Simões *et al* (2007), encontraram os valores 77,13%, 19,30%, 2,60%, e 1,09% para umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, respectivamente, do filé de tilápia-do-Nilo. Para CMS de tilápia-do-Nilo não lavada, Sary *et al*. (2009) encontraram os valores de 74,70%, 10,75%, 12,99% e 1,00% para umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, respectivamente, obtendo resultados próximos ao relatados neste estudo.

Tabela 2 - Composição química centesimal inicial e final da CMS de tilápia-do-Nilo armazenada sob congelamento durante 180 dias.

| Composição química (g/100 g) ⁽¹⁾ | | | | | | |
|---|-------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Tempo | Controle | BHT 0,01 g/100g | PST 0,01 g/100g | PST 0,02 g/100g | PST 0,03 g/100g |
| Um. | i | 77,30±0,85aA ⁽²⁾ | 74,67±0,69aB | 75,62±0,85aB | 75,48±0,64aAB | 75,28±0,38aB |
| | f | 72,55±0,26bA | 71,72±0,68bA | 73,54±0,96aA | 71,92±0,38bA | 72,36±1,00bA |
| Pt. | i | 15,25±0,10aA | 13,00±0,20aB | 13,12±0,21aB | 13,78±0,89aB | 12,64±0,23aB |
| | f | 13,33±0,77bA | 13,87±0,70aA | 13,38±1,37aA | 14,02±0,15aA | 13,44±0,53aA |
| Lp. | i | 12,41±0,36aA | 12,69±0,19aA | 10,66±0,12aB | 11,50±0,34aC | 11,07±0,28aBC |
| | f | 12,63±0,57aA | 13,17±0,61aAC | 13,61±0,40bAC | 14,02±0,29bBC | 12,93±0,21bAC |
| Cz. | i | 0,47±0,04aA | 0,61±0,05aBC | 0,58±0,05aAC | 0,60±0,04aBC | 0,57±0,02aAC |
| | f | 0,73±0,03bA | 0,74±0,08aA | 0,72±0,00bA | 0,70±0,03bA | 0,69±0,02bA |

Um. – Umidade. Pt. – Proteínas. Lp – Lipídios. Cz. – Cinzas. i – Inicial (0 dias). f – Final (180 dias). ⁽¹⁾ Dados expressos com média ± desvio padrão. ⁽²⁾ Letras minúsculas e maiúsculas diferentes na vertical e horizontal, respectivamente, indicam diferenças significativas nas médias, $P < 0,05$.

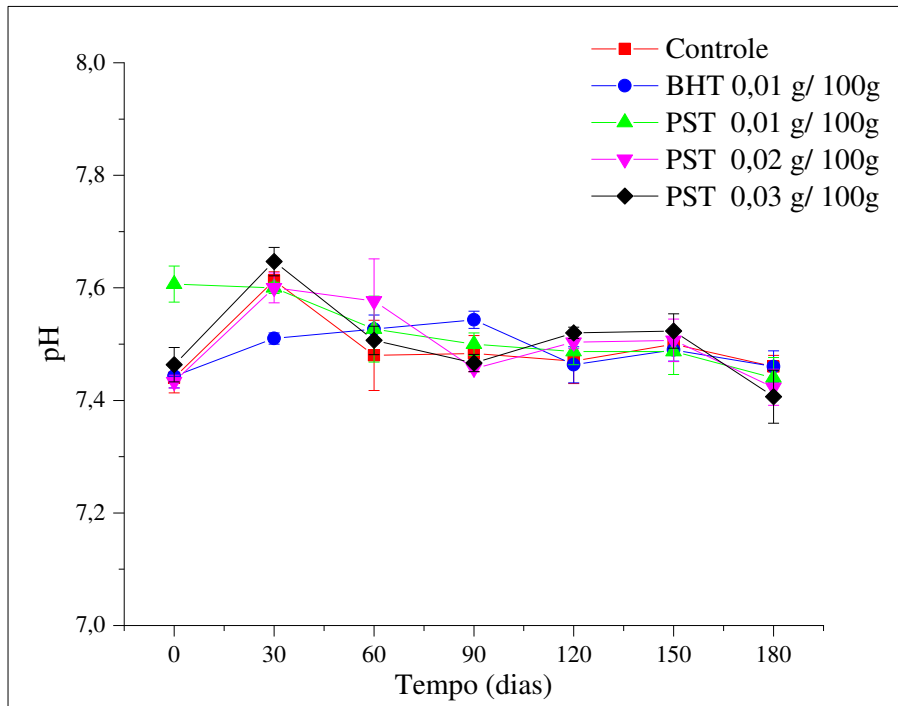
4.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras flutuou entre os valores 7,41 a 7,65, uma diferença de 0,24 na escala logarítmica (gráfico 3). O pH teve um sutil aumento no primeiro mês (30 dias), mas depois estabilizou-se ao longo do experimento. O pH não diferiu entre o início e o término do experimento ($p < 0,05$) com exceção do PST 0,01 g/100g ($p > 0,05$). O pH não diferiu entre os tratamentos no segundo mês (30 dias) e nos dois últimos meses analisados ($p > 0,05$). O pH do pescado fresco está próximo da neutralidade, a verificação de aumentos no pH indica uma série de reações de degradação proteica, como aumento das aminas biogênicas (KIRSCHNIKE; MACEDO-VIEGAS, 2009).

Soares e Gonçalves (2012b) encontraram uma variação de pH de 5,9 a 7,11 para filés de tilápia-do-Nilo armazenadas em gelo durante 15 dias. Demirbas *et al.* ao trabalharem com a CMS da tilápia perca-do-Nilo obtiveram uma variação de pH em torno de 6,20 a 7,40

aproximadamente, num período de 15 dias armazenada em gelo, o que se aproxima do valor mínimo encontrado neste estudo.

Gráfico 3 – Evolução do pH da CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias de estocagem sob congelamento.



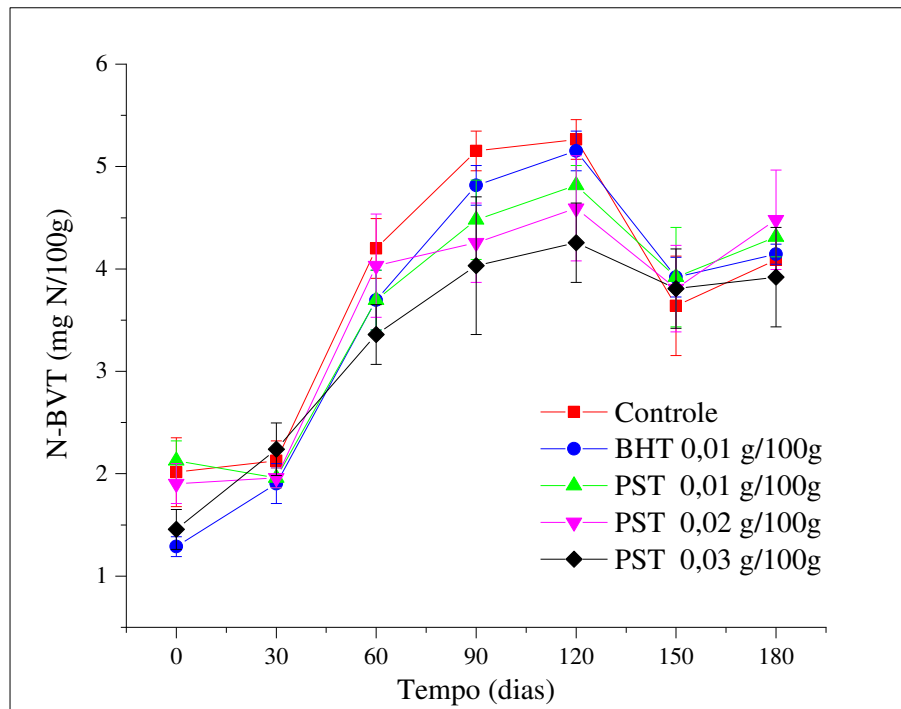
4.4.3 Nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT)

Os ensaios de quantificação das bases voláteis totais apresentaram uma tendência crescente do teor de N durante o armazenamento a -22°C , evoluindo conforme o pescado deteriorava-se. No término do experimento (180 dias) a quantificação de N-BVT não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. A quantificação de N-BVT variou de 1,29 a 5,26 mg de N/100g de amostra de tilápia-do-Nilo. Os resultados apresentados estão de acordo com a legislação (Brasil, 2017) que estabelece o limite de 30 mg de N/100g de amostra em pescados (gráfico 4).

Gutérrez-Guzmán *et al.* (2015) obtiveram um valor mínimo e máximo de 2,8 e 3,1 mg de N/100g, respectivamente, para tilápia-do-Nilo armazenada sob refrigeração (4°C) durante 7 dias. Kirschnik *et al.* (2009) obtiveram resultados próximos com o resultado obtido nesse

estudo, obtendo uma variação de N-BVT de 4,81 a 6,07 mg de N/100g de amostra durante 180 dias de armazenamento da CMS de tilápia-do-Nilo *in natura* sob congelamento.

Gráfico 4 – Evolução do N-BVT da CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias de estocagem sob congelamento.



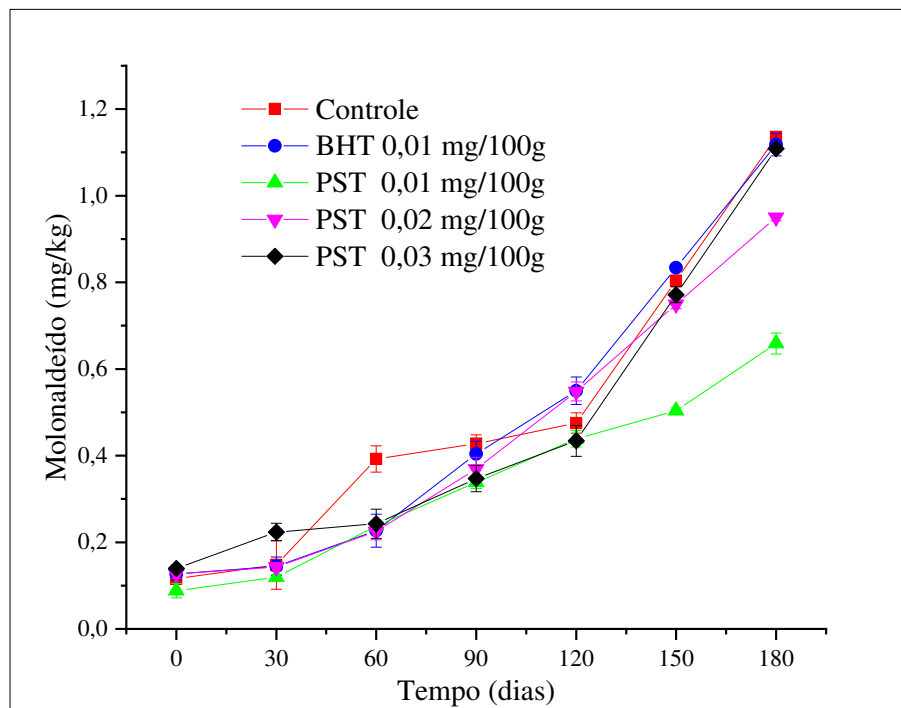
4.4.4 Oxidação lipídica pela determinação das SRATB

O valor das SRATB é um índice de oxidação lipídica que mede o teor de malonaldeído (VYNCKE, 1970). Os resultados da oxidação lipídica mostraram que todos os tratamentos tiveram os valores de malonaldeído incrementados no fim dos 180 dias de armazenamento. Os dados mostraram que o maior valor alcançado foi no tratamento controle com $1,14 \pm 0,01$ mg de malonaldeído/kg de CMS, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos BHT ($1,12 \pm 0,03$) e PST 0,03g/100g ($1,11 \pm 0,01$) ($p < 0,05$). O tratamento com PST 0,01 g/100g foi estatisticamente menos afetada pela oxidação no fim dos 180 dias com $0,66 \pm 0,02$ mg de malonaldeído/Kg de CMS ($p < 0,05$), obtendo um resultado melhor do que o antioxidante BHT no armazenamento sob congelamento. Segundo Connell (1990), o limite entre 1 a 2 mg de malonaldeído/kg de amostra seria o limite aceitável para consumo de peixes. Neste

estudo nenhuma amostra ultrapassou esse limite, o que é um indicativo da qualidade da carne trabalhada (gráfico 5).

Biscalchin-Grýschek *et al* (2003) ao trabalhar com a CMS da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da tilápia-vermelha (*Oreochromis sp.*), obteve o valor 2,75 mg de malonaldeído/kg para CMS da tilápia-vermelha e menos que 1,5 mg de malonaldeído/kg para tilápia-do-Nilo, ambas não lavadas e estocadas a -16 °C durante 180 dias. Kirschnike e Macedo-Viegas (2009) ao trabalharem com CMS de tilápia-do-Nilo, armazenadas durante 180 dias a -18°C, obtiveram valores menores do que os observados neste estudo, sendo o máximo obtido no final do tempo de estocagem de 0,49 mg de malonaldeído/kg para CMS não lavada com aditivos (eritorbato de sódio a 0,1% e tripolifosfato de sódio a 0,5%). Essas diferenças podem ser explicadas pela velocidade das reações de oxidação em detrimento da temperatura de armazenamento, do teor de gordura armazenado no músculo que quanto maior mais suscetível será a oxidação, ou pela conversão do malonaldeído em compostos secundários não mensuráveis nos experimentos (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994; EYMARD, 2005; OGAWA; MAIA, 1999).

Gráfico 5 – Evolução do teor de malonaldeído da CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias de estocagem sob congelamento.



4.4.5 *Coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e Salmonella sp.*

De acordo com os laudos recebidos da empresa contratada para avaliar a conformidade das amostras com o que consta na legislação brasileira sobre limites da presença de bactérias em alimentos, anexos A, B, C e D, nenhuma das amostras enviadas ultrapassou o limite para os teste de contagem para coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella sp.* (tabela 3), o que demonstra a obediência do trinômio higiene, tempo e temperatura ao se manipular corretamente a CMS adquirida para formulação dos tratamentos, como também um reflexo das boas práticas de higiene praticada pelo entreposto de pescado onde se obteve a CMS. A RDC N° 12 (BRASIL, 2001) determina o limite máximo de 10^3 UFC/g para Coliformes a 45°C e também para estafilococos coagulase positiva; e ausência total de *Salmonella sp.*/25g.

Tabela 3 - Contagem inicial de bactérias controladas por legislação em CMS de tilápia-do-Nilo tratadas com os PST da *G. birdiae*.

| Tratamentos | Coliformes a 45°C (UFC/g) | Estafilococos coagulase positiva (UFC/g) | <i>Salmonella sp.</i> (UFC/25 g) |
|----------------------------------|------------------------------|--|-------------------------------------|
| Controle | $<10^1$ ⁽¹⁾ | $<10^1$ | Ausência |
| BHT | $<10^1$ | $<10^1$ | Ausência |
| PST 0,01/100g | $<10^1$ | $<10^1$ | Ausência |
| PST 0,02/100g | $<10^1$ | $<10^1$ | Ausência |
| PST 0,03/100g | $<10^1$ | $<10^1$ | Ausência |
| Referência ⁽²⁾ | $<10^3$ | $<10^3$ | Ausência |

⁽¹⁾ Contagem “ $< 10^1$ ”, significa “ausência” de crescimento no parâmetro analisado. ⁽²⁾ RDC N° 12; *in*: pescados e produtos de pesca, item “e” (BRASIL, 2001).

4.4.6 *Contagem padrão em placas para bactérias psicotróficas*

Devido à falta de regra quanto ao limite de aceitabilidade na contagem para bactérias psicotróficas em território nacional, foi utilizado como referência a “*The International Commission on Microbiological Specifications for Foods*” (1978), que estabelece o limite

máximo de 10^7 UFC/g como limite de qualidade para análises de contagem padrão em placas de microrganismos aeróbicos em peixes frescos, congelados, e defumados a frio.

Neste estudo, nenhuma amostra chegou a atingir esse patamar, estando compreendido entre $8 \cdot 10^4$ a $60 \cdot 10^5$ UFC/g, o que dá um indício juntamente com as outras análises que a CMS ao longo dos 180 dias de estocagem (-22°C), encontrava-se apta para o consumo (tabela 4). A contagem de bactérias psicrotróficas nos tratamentos não diferiu significativamente entre o tempo inicial de estocagem (0 dias) e o término do estudo (180 dias) ($p > 0,05$), com exceção do tratamento controle que teve um crescimento significativo de bactérias nesse período ($p < 0,05$). No último período estudado, foi verificado que entre os tratamentos o maior crescimento alcançado foi no tratamento controle ($p > 0,05$) (tabela 4), sendo que os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Esses resultados podem estar ligados a uma possível atividade antimicrobiana do PST de *G. birdiae*, como também já foi verificado com o antioxidante BHT (TURCOTTE; SAHEB, 1978).

Kirschnik e Macedo-Viegas (2009) obtiveram como resultado para CMS fresca de tilápia-do-Nilo sem lavagem e com/sem adição de aditivos, contagens baixas para psicrotróficas variando de 10^2 a 10^3 UFC/g ao longo de 180 dias submetida ao congelamento a -18°C . Esse resultado reflete a qualidade da CMS fabricada pelos autores que ao contrário desse estudo, não acompanhou o controle sanitário da elaboração da CMS adquirida. Mello *et al.* (2012), a partir de CMS de tilápia-do-Nilo adquirida em entreposto de pesca no estado do Rio de Janeiro, após 30 dias de armazenamento a -18°C , ultrapassou o limite internacional de 10^7 UFC/g (ICMSF, 1978), o que comprova a importância da observância das boas práticas de fabricação para obtenção de um produto de excelente qualidade.

Tabela 4 – Crescimento microbiológico de bactérias heterotróficas psicrotróficas em CMS de tilápia-do-Nilo durante 180 dias sob congelamento.

| Contagem de bactérias psicrotróficas (10^5) ⁽¹⁾ | | | | | |
|--|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Tempo de Estocagem (dias) | Controle | BHT 0,01 g/100g | PST 0,01 g/100g | PST 0,02 g/100g | PST 0,03 g/100g |
| 0 | 22±2aAB ⁽²⁾ | 17±3aA | 26±3aAB | 26±1abAB | 30±0abB |
| 30 | 16±4aA | 12±0aA | 12±1abA | 16±2aA | 17±0aA |
| 60 | 23±1aA | 50±9bA | 36±13abA | 43±12bcA | 49±14bA |
| 90 | 20±1aA | 22±2aA | 8±2aB | 25±1abAC | 31±3abC |
| 120 | 55±1bA | 13±3aB | 42±15bAC | 60±2cA | 26±2aBC |
| 150 | 22±2aA | 23±0aA | 8±2aB | 26±4abAC | 34±1abC |
| 180 | 56±13bA | 19±2aB | 21±4aB | 30±6abB | 26±1aB |

⁽¹⁾ Dados expressos com média ± desvio padrão. ⁽²⁾ Letras minúsculas e maiúsculas diferentes na vertical e horizontal, respectivamente, indicam diferenças significativas nas médias, $P < 0,05$.

Diante dos resultados alcançados com o PST de *G. birdiae* como antioxidante natural, este estudo traz como perspectiva a elaboração de produtos a base de CMS de tilápia-do-Nilo, como *fish burger*, tirinhas empanadas, *nuggets*, apressuntados, embutidos etc. com o polissacarídeo da alga, como forma alternativa de prolongar a vida de prateleira destes produtos.

5 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados do presente estudo podemos apresentar as seguintes conclusões:

- O PST da *G. birdiae* mostra efeitos antioxidantes na redução do radical livre DPPH e agente quelante do íon-ferroso.

- O polissacarídeo sulfatado total (PST) da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, extraído por extração aquosa refinada, sugere uma fonte considerado antioxidante, quando aplicado na carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

- O PST da *G. birdiae* não influencia nas bases voláteis totais ao longo do armazenamento de CMS congelada, mas reduz significativamente o aumento da concentração do malonaldeído.

- A CMS tratada com o PST da *G. birdiae* teve menor crescimento de bactérias psicotróficas que o tratamento controle. Neste trabalho, não houve crescimento de bactérias controladas pela legislação na CMS de tilápia-do-Nilo.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Poliana de Oliveira Cavalcante. **Polissacarídeos obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* J. Agardh**: estudo químico-estrutural e avaliação de atividade antioxidante. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Iota-carrageenans from *Solieria filiformis* (Rhodophyta) and their effects in the inflammation and coagulation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 2, 2012.
- ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1207-1215, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto N° 9.013, de 29 de março de 2017. Brasília, 2017. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm. Acesso em: 27 jun. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução N°12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 24 mai. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o regulamento técnico sobre atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para categoria 8 – carne e produtos cárneos. Brasília, Portaria – nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, 18 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria+n%C2%BA+1004%2C+de+11+de+dezembro+de+1998.pdf/41e1bc8f-b276-4022-9afb-ff0bb3c12c0c>. Acesso em: 24 mai. 2019.
- CHEN, Chihoung; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. **Foodchemistry**, v. 43, n. 3, p. 177-183, 1992
- CONTRERAS-GUZMÁN, Emílio S. **Bioquímica de pescados e derivados**. FUNESP, 1994.
- CORDEIRO, Tatiana Milani. **Galactanas sulfatadas: estrutura química e atividade biológica**. 2014. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

COURA, C. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic e clinical pharmacology e toxicology**, v. 110, n. 4, p. 335-341, 2012.

DERNER, R. B. Cultivo de Macroalgas no Brasil – potencial desperdiçado. **Aquaculture Brasil**, 12ª Ed, 2018. Disponível em: <http://www.aquaculturebrasil.com/2018/09/17/cultivo-de-macroalgas-no-brasil/>. Acesso em: 10 Jun. 2019.

DEMIRBAS, Ayse *et al.* Effect of Red Cabbage Extract on Minced Nile Perch Fish Patties Vacuum Packaged in High and Low Oxygen Barrier Films. **Journal of Applied Packaging Research**, v.9, n.2, p. 4, 2017.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DODGSON, K.S.; PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. **Biochemistry Journal**, v.84, p. 106-110, 1962.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington – DC: APHA, 4 ed., 676 p., 2001.

DRAGNES, B.T *et al.* Utilisation of fish industry residuals: screening the taurine concentration and angiotensin converting enzyme inhibition potential in cod and salmon. **Journal of Food Composition and Analysis**, 22: 714–717, 2009.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350–356, 1956.

EYMARD, Sylvie *et al.* Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1750-1756, 2005.

FAPESP/BIOTA. The Virtual Institute of Biodiversity: Research Program on characterization, conservation and sustainable use of the biodiversity - Marine and freshwater biodiversity: algae. 2014. Disponível em: www.fapesp.br/eventos/2014/12/biota/aquatic.pdf. Acessado em: 27 jun 2019.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018** – Meeting the sustainable development goals. Rome, 2018.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. **Fishery Statistical Collections - Global Aquaculture Production**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>. Acesso em: 24 mai. 2019.

FELTES, Maria *et al.* Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental - Agriambi**, v. 14, n. 6, 2010.

FIELD, R. A. **Mechanically separated meat, poultry and fish**. Advances in meat research (USA), 1988.

FREITAS, Daniela de Grandi Castro *et al.* The sensory acceptability of a tilapia (*Oreochromis niloticus*) mechanically separated meat-based spread. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 166-173, 2012.

FURTADO, Angela Aparecida Lemos. **Pescados**. AGEITEC/EMBRAPA. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5gmye02wyiv80z4s473lakm7pt.html. Acessado em: 27 jun 2019.

GUTÉRREZ-GUZMÁN, Nelson *et al.* Physico-chemical and microbiological changes in commercial tilapia (*Oreochromis niloticus*) during cold storage. **Vitae**, v. 22, n. 2, p. 140-147, 2015.

GONÇALVES, Alex Augusto. Tecnologia do Pescado - Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação. Atheneu, 2011.

GONÇALVES, A. A. Relação água/proteína no pescado – uma nova ferramenta no combate à fraude econômica. **Aquaculture Brasil**, 4ª Ed, 2017. Disponível em: <http://www.aquaculturebrasil.com/2017/04/04/relacao-aguaproteina-no-pescado-uma-nova-ferramenta-no-combate-a-fraude-economica/>. Acesso em: 24 mai. 2019.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Their significance and methods of enumeration: a publication of the international commission on microbiological specifications for foods (ICMSF) of the international association of microbiological societies**. University of Toronto Press, 1988.

KEAY, J. N. **Minced fish**. Aberdeen: Torry Research Station. 6p. (TorryAdivisorynote, 79); 1979.

KIRSCHNIK, P.G. MACEDO-VIEGAS, E. Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a -18°C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 200-206, 2009.

KIRSCHNIK, Peter Gaberz *et al.* Estabilidade em armazenamento da carne de tilápia-do-Nilo mecanicamente separada, lavada, adicionada de conservantes e congelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 935-942, 2013.

KUBITZA, F. A produção de tilápia no Brasil. Acqua Imagem: in: **Portal Matsuda**, 2013. Disponível em: <http://acquaimagem.com.br/website/entrevista-a-produo-de-tilpia-no-brasil/>. Acesso em: 24 mai. 2019.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. **Panorama da Aqüicultura**, v. 10, n. 59, p. 44-53, 2000.

- KUMAR, K. Suresh; GANESAN, K.; RAO, P. V. Subba. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 289-295, 2008.
- LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6 ed. São Paulo: Artimed; 2005. 322 p.
- LYRA, G. M *et al.* Aspectos ecológicos de *Gracilaria* Grev. (Gracilariales, Rhodophyta) em uma praia tropical brasileira. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 11, n. 4, 2011.
- MALLE, P.; TAO, S. H. Rapid quantitative-determination of trimethylamine using steam distillation. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 9, p. 756-760, 1987.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, n.90, n.3, p.329-333, 2003.
- MELO, Karoline Rachel Teodosio *et al.* Caracterização e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marrom *Dictyopteris justii*. **Holos**, v. 1, p. 29-40, 2012.
- MELLO, S. C. R. P. *et al.* Development and bacteriological, chemical and sensory characterization of fishburgers made of Tilapia minced meat and surimi. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1389-1397, 2012.
- NAGAKURA, K. **General analysis**. In: OKADA, M; HIRAO, S.; NOGUCHI, E.; SUZUKI, T.; YOKOSUKI, M. (Eds.), Utilization of marine products, Tokyo, Japan. Overseas Technical Cooperation Agency, p. 159–169, 1972.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.
- NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M. de; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.101-108. 2004.
- OETTERER, M. Técnicas de beneficiamento e conservação do pescado de água doce. **Panorama da Aqüicultura**, v. 8, n. 46, p. 14-20, 1998.
- OGAWA, M; MAIA, E.L. **Manual de Pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, v. 1, 1999.
- OLIVEIRA, Hélder Paulo da Silva. **O consumo de alimentos funcionais: atitudes e comportamentos**. Tese de Doutorado, UFP, 2008.
- OLIVEIRA, N. M. S. *et al.* Avaliação físico-química de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) submetidos à sanitização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008.

PEARSON, D. General methods – basic constituents. In: **Laboratory techniques in food analysis**. New York: John Willey & Sons. p. 27 – 77, 1973.

PEREIRA, J. G. **Variação sazonal de componentes da alga marinha cultivada *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira)**. Dissertação (Dissertação em Bioquímica) – UFC. Fortaleza, 2009.

PESSATTI, M. L. **Aproveitamento dos subprodutos do pescado**. Itajaí: MAPA/UNIVALI, 2001. 130p.

PIRES, D. R.; MORAIS, A. C. N.; COSTA, J. F.; GÓES, L. C. D. S. A. Aproveitamento do resíduo comestível do pescado: Aplicação e viabilidade. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 9(5): 34-46, 2014.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, p. 755-760, 2006.

RIBEIRO, Jéssica Souza *et al.* Natural antioxidants used in meat products: a brief review. **Meat science**, 2018.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum: Technology**, v.33, n.2, p.137-144, 2011.

RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULA, G. A.; BESSA, E. F.; LIMA, T. B.; BENEVIDES, N. M. B.; Isolamento, fracionamento e atividade anticoagulante de *iota*-carragenana da *Solieria filiformis*. **Ciência Rural**, v.40, n.11, p. 2310-2316, 2010a.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Heparinoides naturais isolados de rodófitas (*Halymenia* sp.) arribadas na costa cearense. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v.32, n. 3, p. 235-242, 2010b.

SANTOS RAYMUNDO, Melissa; HORTA, Paulo; FETT, Roseane. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.

SARY, Cesar *et al.* Influência da lavagem da carne mecanicamente separada de tilápia sobre a composição e aceitação de seus produtos. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 7, n. 4, p. 423-432, 2009.

SIMÕES, Marcia Regina *et al.* Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, 2007.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012a.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para o estudo da vida útil de filés de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sem pele, armazenados em gelo. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, 2012b.

SOUSA, Willer Malta de. **Efeito antioxidante e gastroprotetor de uma fração polissacarídica sulfatada isolada da alga vermelha *Solieria filiformis***. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SOUZA, B. W. S. *et al.* Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5589-5594, 2011.

SOUZA, B.W.S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.287-292, 2012.

TURCOTTE, P.; SAHEB, S. A. Antimicrobial activity of phenolic antioxidants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 1306-1320, 1978.

VANDERLEI, Edfranck de Sousa Oliveira *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v. 60, n. 12, p. 1121-1130, 2011.

VIEIRA, Regine Helena Silva dos Fernandes *et al.* **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. Varela, 2004.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.

ANEXOS

ANEXO A– Contagem inicial de coliformes termotolerantes a 45°C, coliformes coagulase positiva e *Salmonella* sp. para o tratamento controle.



LABOR SAÚDE – SERVIÇOS DE ANÁLISES E COMÉRCIO LTDA
 CNPJ: 11.048.968/0001-04
 Rua Antônio Pompeu, 115 | Fortaleza - CE | CEP: 60.040-005 | Centro/José Bonifácio
 +55 85 3472.1326 | +55 85 3472.1921 | +55 85 3099.9455
 www.laborsaude.com | facebook.com/laborsaude | contato@laborsaude.com

Laudo Nº: 11553.2017.B- V.0

01. Dados Contratação:

Solicitante:

Razão Social: Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Endereço: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Proposta Comercial: 4036.2017.V

Contato: Ianna Wivianne F. de Araújo email: iwfaraujo@gmail.com Fone: (85) 3366-9730

2. Dados da Amostragem:

Descrição da Amostra: carne mecanicamente separada de tilápia

Endereço Coleta: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN, Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Data de Coleta: 04/09/2017

Data Recebimento: 04/09/2017 13:55:45

Informações Adicionais: RESPONSÁVEL: IANNA WIVIANE F. DE ARAÚJO; TEMPO: 0 DIAS; D.INÍCIO: 02.09.17; APRESENTAÇÃO: EMBALAGEM PLÁSTICA; JEFFERSON T-0 (CONTROLE)

Matriz e Origem Amostra: Alimento-Alimento

Data Conferência: 16/09/2017 10:16:47

Data Início Amostra: 04/09/2017 15:56:04

Data Conclusão Amostra: 16/09/2017 09:28:56

Característica da Amostra: Simples

Resultados

| Parâmetros | Resultados | Un | Resolução RDC nº 12 | Início Ensaio | L.Q. | Metodologia |
|----------------------------------|------------|---------|---------------------|---------------|------|-------------|
| COLIFORMES À 45°C | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| SALMONELLA SP | Ausência | UFC/25g | Ausência | 04/09/2017 | - | CMMEF |

Opiniões e Interpretações: Produto de acordo com os padrões legais vigentes.

Legislação: Valores de referência estabelecidos conforme Resolução RDC N°12, de 2 de janeiro de 2001/ANVISA.

Referência(s) Normativa(s): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 4 Ed,

Legenda:

UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por Grama, UFC/25g - Unidade Formadora de Colônia por 25 gramas,

L.Q. - Limite de Quantificação, VMP - Valor Máximo Permitido, N.A. - Não Aplicável

Relatório de Ensaio tipo B

3. Informações Importantes

< 1,0 x 10 UFC/g ou mL equivale na metodologia utilizada "Ausência" de crescimento do parâmetro analisado.

O presente resultado restringe-se a amostra analisada.

Código de Verificação: 00050576822244340201700000

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁL. E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Glaubéria Temoteo Bento
 Responsável Técnica
 CPF: 951.245.033-34 / CRQ: 10300287

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Francisco Airton Abrantes de Lima
 Sócio
 CPF: 036.393.983-00 / CRQ: 10700250-Técnico

ANEXO B – Contagem inicial de coliformes termotolerantes a 45°C, coliformes coagulase positiva e *Salmonella* sp. para o tratamento controle positivo (BHT).



LABOR SAÚDE – SERVIÇOS DE ANÁLISES E COMÉRCIO LTDA
 CNPJ: 11.048.968/0001-04
 Rua Antônio Pompeu, 115 | Fortaleza - CE | CEP: 60.040-005 | Centro/José Bonifácio
 +55 85 3472.1326 | +55 85 3472.1921 | +55 85 3099.9455
 www.laborsaude.com | facebook.com/laborsaude | contato@laborsaude.com

Laudo Nº: 11555.2017.B- V.0

01. Dados Contratação:

Solicitante:

Razão Social: Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Endereço: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Proposta Comercial: 4036.2017.V

Contato: Ianna Wivianne F. de Araújo email: iwfaraujo@gmail.com Fone: (85) 3366-9730

2. Dados da Amostragem:

Descrição da Amostra: carne mecanicamente separada de tilápia

Endereço Coleta: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN, Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Data de Coleta: 04/09/2017

Data Recebimento: 04/09/2017 14:00:21

Informações Adicionais: RESPONSÁVEL: IANNA WIVIANE F. DE ARAÚJO; TEMPO: O DIAS; D.INÍCIO: 02.09.17; APRESENTAÇÃO: EMBALAGEM PLÁSTICA; JEFFERSON T-0 (CONTROLE BHT - 0,01g/100g)

Matriz e Origem Amostra: Alimento-Alimento

Data Conferência: 16/09/2017 10:18:06

Data Início Amostra: 04/09/2017 15:56:04

Data Conclusão Amostra: 16/09/2017 09:28:56

Característica da Amostra: Simples

Resultados

| Parâmetros | Resultados | Un | Resolução RDC nº 12 | Início Ensaio | L.Q. | Metodologia |
|----------------------------------|------------|---------|---------------------|---------------|------|-------------|
| COLIFORMES À 45°C | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| SALMONELLA SP | Ausência | UFC/25g | Ausência | 04/09/2017 | - | CMMEF |

Opiniões e Interpretações: Produto de acordo com os padrões legais vigentes.

Legislação: Valores de referência estabelecidos conforme Resolução RDC Nº12, de 2 de janeiro de 2001/ANVISA.

Referência(s) Normativa(s): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 4 Ed,

Legenda:

UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por Grama, UFC/25g - Unidade Formadora de Colônia por 25 gramas,

L.Q. - Limite de Quantificação, VMP - Valor Máximo Permitido, N.A. - Não Aplicável

Relatório de Ensaio tipo B

3. Informações Importantes

< 1,0 x 10 UFC/g ou mL equivale na metodologia utilizada "Ausência" de crescimento do parâmetro analisado.

O presente resultado restringe-se a amostra analisada.

Código de Verificação: 00050576822244360201700000

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁL. E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Glaubénia Temoteo Bento
 Responsável Técnica
 CPF: 951.235.013-34 / CRQ: 10300287

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Francisco Airton Abrantes de Lima
 Sócio
 CPF: 036.393.983-00 / CRQ: 10700250-Técnico

ANEXO C – Contagem inicial de coliformes termotolerantes a 45°C, coliformes coagulase positiva e *Salmonella* sp. para o tratamento PST 0,01g /100g.



LABOR SAÚDE – SERVIÇOS DE ANÁLISES E COMÉRCIO LTDA
 CNPJ: 11.048.968/0001-04
 Rua Antônio Pompeu, 115 | Fortaleza - CE | CEP: 60.040-005 | Centro/José Bonifácio
 +55 85 3472.1326 | +55 85 3472.1921 | +55 85 3099.9455
 www.laborsaude.com | facebook.com/laborsaude | contato@laborsaude.com

Laudo N°: 11554.2017.B- V.0

01. Dados Contratação:

Solicitante:

Razão Social: Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Endereço: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Proposta Comercial: 4036.2017.V

Contato: Ianna Wivianne F. de Araújo email: iwfaraujo@gmail.com Fone: (85) 3366-9730

2. Dados da Amostragem:

Descrição da Amostra: carne mecanicamente separada de tilápia

Endereço Coleta: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN, Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Data de Coleta: 04/09/2017

Data Recebimento: 04/09/2017 13:58:24

Informações Adicionais: RESPONSÁVEL: IANNA WIVIANE F. DE ARAÚJO; TEMPO: O DIAS; D. INÍCIO: 02.09.17; APRESENTAÇÃO: EMBALAGEM PLÁSTICA; JEFFERSON T-0 (GRACILARIA BRINDIAE - 0,01g/100g)

Matriz e Origem Amostra: Alimento-Alimento

Data Conferência: 16/09/2017 10:17:34

Data Início Amostra: 04/09/2017 15:56:04

Data Conclusão Amostra: 16/09/2017 09:28:56

Característica da Amostra: Simples

Resultados

| Parâmetros | Resultados | Un | Resolução RDC nº 12 | Início Ensaio | L.Q. | Metodologia |
|----------------------------------|------------|---------|---------------------|---------------|------|-------------|
| COLIFORMES À 45°C | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| SALMONELLA SP | Ausência | UFC/25g | Ausência | 04/09/2017 | - | CMMEF |

Opiniões e Interpretações: Produto de acordo com os padrões legais vigentes.

Legislação: Valores de referência estabelecidos conforme Resolução RDC N°12, de 2 de janeiro de 2001/ANVISA.

Referência(s) Normativa(s): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 4 Ed,

Legenda:

UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por Grama, UFC/25g - Unidade Formadora de Colônia por 25 gramas,

L.Q. - Limite de Quantificação, VMP - Valor Máximo Permitido, N.A. - Não Aplicável

Relatório de Ensaio tipo B

3. Informações Importantes

< 1,0 x 10 UFC/g ou mL equivale na metodologia utilizada "Ausência" de crescimento do parâmetro analisado.

O presente resultado restringe-se a amostra analisada.

Código de Verificação: 00050576822244350201700000

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Glaubéria Temoteo Bento
 Responsável Técnica
 CPF: 951.241.011-34 / CRQ: 10300287

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Francisco Ailton Abrantes de Lima
 Sócio
 CPF: 036.393.983-00 / CRQ: 10700250-Técnico

ANEXO D – Contagem inicial de coliformes termotolerantes a 45°C, coliformes coagulase positiva e *Salmonella* sp. para o tratamento PST 0,02g /100g.



LABOR SAÚDE – SERVIÇOS DE ANÁLISES E COMÉRCIO LTDA
 CNPJ: 11.048.968/0001-04
 Rua Antônio Pompeu, 115 | Fortaleza - CE | CEP: 60.040-005 | Centro/José Bonifácio
 +55 85 3472.1326 | +55 85 3472.1921 | +55 85 3099.9455
 www.laboraude.com | facebook.com/laboraude | contato@laboraude.com

Laudo Nº: 11557.2017.B- V.0

01. Dados Contratação:

Solicitante:

Razão Social: Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Endereço: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Proposta Comercial: 4036.2017.V

Contato: Ianna Wivianne F. de Araújo email: iwfaraujo@gmail.com Fone: (85) 3366-9730

2. Dados da Amostragem:

Descrição da Amostra: carne mecanicamente separada de tilápia

Endereço Coleta: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN, Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Data de Coleta: 04/09/2017

Data Recebimento: 04/09/2017 14:11:32

Informações Adicionais: RESPONSÁVEL: IANNA WIVIANE F. DE ARAÚJO; TEMPO: O DIAS; D. INÍCIO: 02.09.17; APRESENTAÇÃO: EMBALAGEM PLÁSTICA; JEFFERSON T-0 (GRACILARIA BIRDIAE - 0,02g/100g)

Matriz e Origem Amostra: Alimento-Alimento

Data Conferência: 16/09/2017 10:19:10

Data Início Amostra: 04/09/2017 15:56:04

Data Conclusão Amostra: 16/09/2017 09:28:56

Característica da Amostra: Simples

Resultados

| Parâmetros | Resultados | Un | Resolução RDC nº 12 | Início Ensaio | L.Q. | Metodologia |
|----------------------------------|------------|---------|---------------------|---------------|------|-------------|
| COLIFORMES À 45°C | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| SALMONELLA SP | Ausência | UFC/25g | Ausência | 04/09/2017 | - | CMMEF |

Opiniões e Interpretações: Produto de acordo com os padrões legais vigentes.

Legislação: Valores de referência estabelecidos conforme Resolução RDC Nº12, de 2 de janeiro de 2001/ANVISA.

Referência(s) Normativa(s): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 4 Ed,

Legenda:

UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por Grama, UFC/25g - Unidade Formadora de Colônia por 25 gramas,

L.Q. - Limite de Quantificação, VMP - Valor Máximo Permitido, N.A. - Não Aplicável

Relatório de Ensaio tipo B

3. Informações Importantes

< 1,0 x 10 UFC/g ou mL equivale na metodologia utilizada "Ausência" de crescimento do parâmetro analisado.

O presente resultado restringe-se a amostra analisada.

Código de Verificação: 00050576822244380201700000

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁL. E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Glaubéria Temoteo Bento
 Responsável Técnica
 CPF: 051.313.813-34 / CRC: 10300287

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Francisco Airton Abrantes de Lima
 Sócio
 CPF: 036.393.983-00 / CRC: 10700250-Técnico

ANEXO D – Contagem inicial de coliformes termotolerantes a 45°C, coliformes coagulase positiva e *Salmonella* sp. para o tratamento PST 0,03g /100g.



LABOR SAÚDE – SERVIÇOS DE ANÁLISES E COMÉRCIO LTDA
 CNPJ: 11.048.968/0001-04
 Rua Antônio Pompeu, 115 | Fortaleza - CE | CEP: 60.040-005 | Centro/José Bonifácio
 +55 85 3472.1326 | +55 85 3472.1921 | +55 85 3099.9455
 www.laboraude.com | facebook.com/laboraude | contato@laboraude.com

Laudo Nº: 11556.2017.B- V.0

01. Dados Contratação:

Solicitante:

Razão Social: Ianna Wivianne Fernandes de Araújo

Endereço: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Proposta Comercial: 4036.2017.V

Contato: Ianna Wivianne F. de Araújo email: iwfaraujo@gmail.com Fone: (85) 3366-9730

2. Dados da Amostragem:

Descrição da Amostra: carne mecanicamente separada de tilápia

Endereço Coleta: Rua Campus do Pici, Laboratório de Bioquímica Marinha, SN, Bloco 872 - Pici - Fortaleza/CE CEP: 60440900

Data de Coleta: 04/09/2017

Data Recebimento: 04/09/2017 14:10:26

Informações Adicionais: RESPONSÁVEL: IANNA WIVIANE F. DE ARAÚJO; TEMPO: 0 DIAS; D.INÍCIO: 02.09.17; APRESENTAÇÃO: EMBALAGEM PLÁSTICA; JEFFERSON T-0 (GRACILARIA BIRDIAE - 0,03g/100g)

Matriz e Origem Amostra: Alimento-Alimento

Data Conferência: 16/09/2017 10:18:35

Data Início Amostra: 04/09/2017 15:56:04

Data Conclusão Amostra: 16/09/2017 09:28:56

Característica da Amostra: Simples

Resultados

| Parâmetros | Resultados | Un | Resolução RDC nº 12 | Início Ensaio | L.Q. | Metodologia |
|----------------------------------|------------|---------|---------------------|---------------|------|-------------|
| COLIFORMES À 45°C | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA | < 1,0 x 10 | UFC/g | 10 ³ | 04/09/2017 | - | CMMEF |
| SALMONELLA SP | Ausência | UFC/25g | Ausência | 04/09/2017 | - | CMMEF |

Opiniões e Interpretações: Produto de acordo com os padrões legais vigentes.

Legislação: Valores de referência estabelecidos conforme Resolução RDC Nº12, de 2 de janeiro de 2001/ANVISA.

Referência(s) Normativa(s): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 4 Ed,

Legenda:

UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por Grama, UFC/25g - Unidade Formadora de Colônia por 25 gramas,

L.Q. - Limite de Quantificação, VMP - Valor Máximo Permitido, N.A. - Não Aplicável

Relatório de Ensaio tipo B

3. Informações Importantes

< 1,0 x 10 UFC/g ou mL equivale na metodologia utilizada "Ausência" de crescimento do parâmetro analisado.

O presente resultado restringe-se a amostra analisada.

Código de Verificação: 00050576822244370201700000

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Glaubéria Temoteo Bento
 Responsável Técnica
 CPF: 051.315.013-34 / CRQ: 19306287

LABOR SAÚDE SERV. DE ANÁLISE E COM. LTDA-EPP
 CNPJ: 11.048.968/0001-04

 Francisco Airton Abrantes de Lima
 Sócio
 CPF: 036.393.983-00 / CRQ: 10700250-Técnico