



*Produção e caracterização da capacidade antioxidante
de gelo suplementado com extrato de Fucus spiralis*

Ana Inês Carrolo Rodrigues



*Produção e caracterização da capacidade antioxidante de gelo suplementado com extrato de *Fucus spiralis**

Ana Inês Carrolo Rodrigues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Rui Pedrosa

2011

Título: *Produção e caracterização da capacidade antioxidante de gelo suplementado com extrato de Fucus spiralis*

Copyright © Ana Inês Carolo Rodrigues

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2011

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

Aos meus pais, por todo o apoio, paciência e dedicação.

Ao Bernardo, por ser um irmão extraordinário.

Ao Tiago, pelo apoio, carinho e amizade ao longo de todos estes anos.

Agradecimentos

Ao Doutor Rui Pedrosa, pela orientação científica desta tese, por estar sempre presente para qualquer esclarecimento e por participar na minha formação científica e pessoal. Obrigada!

À equipa que faz parte deste projeto, à Susete, ao Celso, ao Hugo e ao Ernesto.

Aos amigos e colegas, pelo companheirismo e por todos os momentos bem passados ao longo destes anos.

À amiga e professora Susana Mendes, por nunca me deixar desistir nos momentos mais difíceis.

Aos técnicos Cristina Salas, Pedro Ramalho, Vera Severiano e Inês Barros, pela ajuda prestada sempre que necessitei.

Resumo

Resumo

O peixe fresco é suscetível à deterioração causada por reações microbiológicas e químicas. A deterioração lipídica ocorre facilmente e limita a vida de prateleira de peixes gordos durante o armazenamento. Compostos bioativos, como compostos fenólicos presentes em algas como a *Fucus spiralis* com elevada capacidade antioxidante podem ser utilizadas para retardar ou inibir os processos de oxidação lipídica no pescado fresco.

No presente trabalho, avaliou-se a eficiência da utilização Algelo, gelo suplementado com extrato da alga *Fucus spiralis*, na estabilidade oxidativa da sardinha (*Sardina pilchardus*).

Os compostos bioativos foram extraídos da alga *Fucus spiralis* com recurso a solventes polares, a água e o etanol com diferentes proporções. Foi avaliada a capacidade antioxidante das diferentes extrações e do Algelo através de dois métodos, a Quantificação Total de Polifenóis (QTP) e a capacidade de redução do radical 1, 1-Diphenyl2-picrylhydrazyl (DPPH). A estabilidade oxidativa da sardinha foi avaliada pela determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) e pela determinação dos parâmetros de cor L* e a*.

As extrações com etanol demonstraram elevada capacidade de captação de compostos fenólicos, sendo esta capacidade independente da % de etanol. As soluções resultantes da extração da alga *Fucus spiralis* demonstraram estabilidade antioxidante durante 60 dias. No entanto, o Algelo mostrou pouca capacidade para reter os compostos antioxidantes, sendo estes maioritariamente lixiviados na água de degelo. Foram feitas duas concentrações da solução utilizada para produção de Algelo, 100 / e 500 mg de eq. de ácido gálico /l, de modo a avaliar o efeito deste na oxidação lipídica dos filetes de sardinha. Apenas a concentração de Algelo mais elevada mostrou reduzir a oxidação lipídica da sardinha às 48 horas. Os parâmetros de cor L* e a* da sardinha não foram alterados pela presença do Algelo.

Como conclusão, podemos afirmar que a solução de gelo suplementado com extratos de *Fucus spiralis* tem elevada capacidade antioxidante, sendo estável ao longo do tempo. O Algelo não se mostrou muito eficaz na inibição da oxidação lipídica da sardinha, facto que poderá estar relacionado com a perda da capacidade antioxidante do Algelo à superfície, com perda das moléculas antioxidante na água de degelo.

Palavras chave: Atividade antioxidante, *Fucus spiralis*, Gelo suplementado.

Abstract

Abstract

Fresh fish is susceptible to deterioration induced by microbiological and chemical reactions. The lipid oxidation occurs rapidly and limits the shelf life of fatty fish during storage. Bioactive compounds, such as phenolic compounds present in algae such as *Fucus spiralis* with high antioxidant capacity can be used to delay or inhibit lipid oxidation on fresh fish.

In this study, we evaluated the efficiency of the use of Algelo, supplemented ice with alga *Fucus spiralis* extract, on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*). The bioactive compounds were extracted from the alga *Fucus spiralis* using polar solvents with different ratios of water and ethanol. We evaluated the antioxidant capacity of the different extractions and Algelo by two methods, the quantification of the Total Polyphenol Contents (QTP) and the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity.

The oxidative stability of sardine was assessed by evaluation of the thiobarbituric acid (TBA) contents and also by color changes associated to the L* and a* color parameters.

Extractions with ethanol showed high capacity for phenolic compound extraction, which was ethanol (%) independent. The solutions resulting from the extraction of the alga *Fucus spiralis* showed an antioxidant stability during 60 days. However, the Algelo showed little ability to retain the antioxidant compounds, which are mostly leached in meltwater. In order to evaluate the lipid oxidation of sardines fillets we used two concentrations of Algelo solutions (100 and 500 mg of gallic acid eq. / l) . Only the highest concentration of Algelo prevented the lipid oxidation of sardines, but only at 48 hours. Algelo did not change the sardine L* and a* color parameters. As conclusion we can say that ice supplemented solution with *Fucus spiralis* extracts have high antioxidant capacity and is very stable. The Algelo was not very effective in inhibiting sardine lipid oxidation, which could be related to the loss of antioxidant capacity of Algelo surface, with leakage of antioxidant molecules in the meltwater.

Keywords: Antioxidant activity, *Fucus spiralis*, Ice supplemented.

Índice

	Página
Resumo.....	ix
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Biodiversidade marinha.....	3
1.2. Radicais livres e antioxidantes.....	5
1.3. A deterioração do pescado e a oxidação lipídica.....	6
1.4. Sardinha: pescado de excelência vs sensibilidade à oxidação lipídica.....	8
2. Objetivos.....	11
3. Materiais e métodos.....	15
3.1. Recolha e preparação das amostras.....	17
3.2. Preparação das extrações.....	17
3.3. Avaliação da Capacidade Antioxidante.....	18
3.3.1. Quantificação Total de Polifenóis (QTP).....	18
3.3.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH.....	19
3.4. Processamento da sardinha.....	20
3.5. Avaliação da cor da sardinha.....	21
3.6. Teor de humidade.....	22
3.7. Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA).....	22
3.8. Análise estatística.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Caracterização do processo de extração e da estabilidade antioxidante dos extratos de <i>Fucus spiralis</i> antes e após a produção do gelo suplementado.....	27
4.2. Caracterização da estabilidade oxidativa dos extratos de <i>Fucus spiralis</i> antes e após a produção de gelo suplementado.....	30

4.3.Avaliação da estabilidade oxidativa da sardinha na presença de gelo suplementado com extratos de <i>Fucus spiralis</i>	32
5. Discussão e Conclusão.....	41
6. Perspetivas Futuras.....	49
7. Bibliografia.....	53

Introdução

1. Introdução

1.1. Biodiversidade marinha

Os oceanos são uma importante fonte de diversidade biológica e química. Estes cobrem mais de 70% da superfície da Terra e contêm mais de 300.000 espécies descritas de plantas e animais. Esta elevada biodiversidade marinha despertou a curiosidade de muitos investigadores, não só na procura de novas espécies, mas também no estudo da evolução que permitiu a sua adaptação ao meio marinho (Targett *et al.*, 2002).

Em resposta a pressões ecológicas, tais como competição pelo espaço, a defesa contra predadores e a capacidade de se reproduzirem com sucesso, estes organismos produzem inúmeros compostos resultantes do seu metabolismo secundário que têm revelado possuir bioatividades interessantes, que podem ser utilizadas na indústria alimentar, farmacêutica, entre outras (Duan *et al.*, 2006; Shanmughapriya *et al.*, 2008).

Neste contexto podem-se destacar as algas. As algas são organismos fotossintéticos, que possuem estruturas reprodutivas simples e constituem um total de 25000-30000 espécies, com uma grande diversidade de formas e tamanhos que podem existir desde organismos unicelulares microscópicas (microalgas) até organismos multicelulares de grande tamanho (macroalgas) (Plaza, 2008). Na verdade, algumas algas vivem em habitats complexos submetidos a condições extremas como alterações de salinidade, temperatura, nutrientes, a radiação ultra violeta (UV) e portanto, possuem um metabolismo eficaz que lhes permite sobreviver, através da produção de uma grande variedade de metabolitos secundários (biologicamente ativos) (Plaza, 2008)

Apesar da maior parte das plantas fotossintéticas e das algas estarem expostas a uma combinação luz solar, transporte elevado de eletrões e elevadas concentrações de oxigénio, combinação perfeita para a formação de radicais livres e outros agentes oxidantes fortes, estas raramente sofrem danos fotodinâmicos *in vivo*. Os estudos realizados sugerem que as suas células têm mecanismos de proteção antioxidante associados a uma elevada concentração de compostos antioxidantes (Chang-Bum *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, as macroalgas e os seus extratos têm sido estudadas como novas fontes produtoras de uma ampla gama de moléculas bioativas com elevado potencial antioxidante e antiproliferativo para utilização medicinal (Chew *et al.*, 2008; Díaz-Rubio *et al.*, 2008; Heo *et al.*, 2005). Segundo Salvador e colaboradores (2007) existem inúmeros relatos de compostos derivados de macroalgas, com várias atividades biológicas, tais como

atividade antimicrobiana, antiviral, antineoplásica, anti-incrustante, anti-inflamatória e antimitótica.

Neste contexto, as algas castanhas têm sido amplamente estudadas devido a possuírem um grupo único de moléculas denominadas florotaninas e por serem, quase todas, algas edíveis. As florotaninas são o maior grupo de polifenóis detetado em algas castanhas, que quando purificados demonstram possuir uma forte capacidade antioxidante (Wang *et al.*, 2009). Sabe-se que a produção destes compostos, constituintes da parede celular (nomeadamente na *Fucus spiralis*), têm funções de regeneração celular, bem como de defesa contra fungos e bactérias e proteção contra herbívoros, proteção ultra violeta e são consideradas substâncias osmorreguladoras (Schoenwaelder e Wiencke, 2000; Swanson e Druehl, 2002; Nagayama *et al.*, 2002; Matsukawa *et al.*, 1997; Koivikko *et al.*, 2005). Para além destas características, demonstram possuir uma forte capacidade antioxidante e como tal, têm sido alvo de diversos estudos para o tratamento profilático de doenças como por exemplo as doenças cardiovasculares, disfunção erétil e cancro (Kang *et al.*, 2003; Matsukawa *et al.*, 1997). Para além das florotaninas, já foram identificados em algas castanhas compostos fenólicos como fucóis, fluretóis, fucofluretóis, fucoxantina, entre outros (Chkhikvishvili *et al.*, 1999; Sadati *et al.*, 2011).

A alga *Fucus spiralis* (Fig.1) pertence ao filo Heterokontophyta (algas castanhas) e à ordem Fucales. É uma espécie perene, comum no patamar médio litoral formando faixas nítidas nalgumas zonas rochosas costeiras, como é exemplo a costa de Peniche.

Esta alga possui talos com 10 a 50 cm de comprimento, de estrutura cartilaginosa, fixa a um substrato por um pequeno disco a partir do qual se desenvolve uma lâmina com nervura central que se divide dicotomicamente (Pereira, 2009). Nas zonas apicais encontram-se os órgãos reprodutores denominados conceptáculos, que são de contorno circular, rodeados por uma estreito rebordo da fronde estéril. Esta espécie pode tolerar um alto nível de dessecação, passando 90 por cento do tempo fora de água, sendo capaz de sobreviver à perda de 70-80 por cento de água.



Figura 1 – *Fucus spiralis* (local: praia Marques Neves; fonte própria).

1.2. Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos produzidos naturalmente no organismo. Além do normal funcionamento do corpo, fatores ambientais como radiação, poluição, má nutrição e tabagismo, podem levar à formação de mais radicais livres, resultando no *stress* oxidativo. Esse processo pode ser prejudicial à saúde, por causar um estado de oxidação celular, podendo desenvolver diversas patologias associadas ao envelhecimento como a aterosclerose, diabetes e cancro (Vargas *et al.*, 2008).

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação e/ou bloqueiam a capacidade oxidante dos radicais livres, prevenindo deste modo o aparecimento de doenças. Desta forma, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante.

Os antioxidantes são de facto compostos capazes de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, através da doação de átomos de hidrogénio, interrompendo as reações de proliferação oxidativa em cadeia (Soares, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de oxidação-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres.

1.3. A deterioração do pescado e a oxidação lipídica

O peixe fresco é suscetível à deterioração causada por reações microbiológicas e químicas. A deterioração lipídica ocorre facilmente e limita o tempo de prateleira de peixes gordos durante o armazenamento. Tanto a rancidez hidrolítica como a oxidativa no músculo do peixe estão associadas à deterioração da qualidade.

A hidrólise, induzida por lipases e fosfolipases, produz ácidos gordos que sofrem oxidação adicional para a produção de compostos de baixo peso molecular, que são responsáveis pelo sabor a ranço do peixe e dos produtos da pesca.

A deterioração do pescado ocorre logo após a morte, os compostos lipídicos do *post-mortem* do tecido muscular de peixes são propensos à oxidação, pois os ácidos gordos existentes nos peixes são muito mais insaturados do que os dos mamíferos e aves.

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração da qualidade em alimentos musculares após o armazenamento em temperaturas refrigeradas ou congeladas. Muitas vezes, em fases posteriores de armazenamento, as perdas de qualidade são manifestadas através de uma variedade de mecanismos, tais como os produtos de oxidação do colesterol, com implicações potencialmente prejudiciais à saúde, a desnaturação das proteínas e alteração de funcionalidade, alterações na pigmentação, como sejam a perda da pigmentação vermelha (carotenoides) e passagem da mioglobina (vermelho) a metamioglobina (castanho). A formação de metamioglobina tem correlação positiva com a oxidação lipídica e deste modo a avaliação da cor de um produto alimentar pode ser utilizada como medida indireta para aferir o estado de oxidação. A mioglobina e outras proteínas, enzimáticas ou não, contendo grupo heme, podem funcionar como prooxidantes no tecido muscular. Chaijan e colaboradores (2005) verificaram que a liberação do ferro na sardinha e cavala durante o armazenamento congelado pode estar associado com o processo de oxidação induzida no músculo. Na realidade, sistemas de redução enzimáticos e não enzimáticos convertem ferro da sua forma inativa, férrica, para o estado ativo de ferro ferroso, podem acelerar a oxidação da carne. Por outro lado, os componentes da membrana, tais como citocromos ou proteínas com centro de ferro independentes do grupo heme, são capazes de converter espécies como radical superóxido, em espécies mais reativas, como o radical hidroxilo. A conversão de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em radical hidroxilo (OH^{\cdot}) favorece as reações de oxidação (Chaijan *et al.*, 2005).

Os principais componentes envolvidos na oxidação lipídica, são ácidos gordos insaturados, radicais livres e oxigénio. Neste processo, o oxigénio atmosférico liga-se aos ácidos gordos insaturados após oxidação, criando intermediários instáveis (radicais

peróxilos), que têm uma capacidade brutal de propagação da reação oxidativa, e cuja quebra leva à formação de compostos com sabor e aroma desagradáveis. Embora a oxidação enzimática e fotogénica possam ser importantes, o processo mais comum que leva à deterioração oxidativa, definido como reação espontânea do oxigénio atmosférico com lípidos, é a auto-oxidação (Erickson, 2002; Shahidi *et al.* 2005). Tal como foi anteriormente referido, os ácidos gordos insaturados são geralmente afetados por estas reações.

A auto-oxidação de ácidos gordos insaturados ocorre através de uma reação em cadeia de radicais livres que prossegue através de três etapas, iniciação, propagação e terminação. A seguinte tabela pretende explicar, de um modo simples, o mecanismo de auto-oxidação (Adaptado a partir de Ferrari, 1998):

Tabela I: Fases do processo de peroxidação lipídica.

Iniciação	$R-H + \text{iniciador} \rightarrow R^{\bullet}$ (Radical carbonilo)
Propagação	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$ (Radical peróxilo) $RO_2^{\bullet} + R-H \rightarrow R^{\bullet} + ROOH$ (Lipohidroperóxido) $2ROOH \rightarrow RO_2^{\bullet} + RO^{\bullet} + H_2O$
Terminação	$RO_2^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$ $RO_2^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$ $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$ (Dímeros ou polímeros)

A auto-oxidação dos lípidos é iniciada por radicais livres, produzidos por auto-oxidação; hidroperóxidos produzidos pela auto-oxidação são decompostos, produzindo radicais livres que iniciam as reações de oxidação. No princípio, a concentração de radicais livres é muito reduzida, e a oxidação é lenta. Gradualmente, a concentração de hidroperóxidos e de outros produtos de oxidação aumenta e a concentração dos radicais livres formados durante a decomposição aumenta de modo semelhante, levando ao aumento exponencial da taxa global da oxidação. Uma vez iniciada, a reação segue em cadeia e termina apenas quando as reservas de ácidos gordos insaturados e oxigénio estiverem esgotadas (Pokorny, 2007).

As reações de propagação levam à formação de diversos peróxidos, que podem ser medidos, servindo como índice de oxidação lipídica em alimentos. Os radicais livres, suscetíveis ao ataque do oxigénio atmosférico, são convertidos noutros radicais, aparecendo

os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes. Estes radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando, como referido anteriormente, num processo autocatalítico (Ferrari, 1998; Ramalho *et al.*, 2006).

Estes ácidos gordos podem levar ao aparecimento de colorações castanhas ou amarelas no músculo do peixe.

Contudo, como os peróxidos são instáveis a sua medição é limitada às fases iniciais da oxidação lipídica, já que as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação. Nesta fase, o aldeído malónico, é um dos produtos secundários resultantes do processo de oxidação lipídica, sendo utilizado para avaliar o estado de oxidação lipídica (Osawa, *et al.* 2005). Com o fim dos substratos, as reações de propagação vão cessando e inicia-se a formação dos produtos finais. Deste modo, as reações de terminação têm como característica a formação de produtos finais estáveis ou não reativos.

1.4.Sardinha: pescado de excelência vs sensibilidade à oxidação lipídica

O pescado representa uma das principais fontes de proteína de origem animal utilizada nos países em desenvolvimento. Na atualidade, seu consumo ainda está associado a problemas de saúde, principalmente devido às deficientes práticas de manuseio e armazenamento (Huss, 1997).

O pescado é altamente perecível. Traumas mecânicos e refrigeração deficiente podem ocorrer em etapas que antecedem ao consumo, tanto a bordo das embarcações pesqueiras, logo após a captura, como em terra, durante o transporte rodoviário, ou na distribuição, desencadeando processos autolíticos e desenvolvimento microbiológico (Ashie *et al.*, 1996). No entanto, a prevenção deste tipo de fenómenos é problemática pelo facto do pescado estar sujeito a vários processos de deterioração devido à sua composição, às condições de captura, armazenamento e da intensidade de manuseio que levam à rápida alteração da atividade enzimática e bacteriana (Louka *et al.*, 2004).

Neste contexto, a Sardinha (*Sardina pilchardus* Walbaum) (Fig.3) é um pequeno pelágico que pela sua abundância, assume grande importância não só no setor Português da pesca, representando aproximadamente 50% das capturas totais anuais, como também mundialmente (Fig. 2).

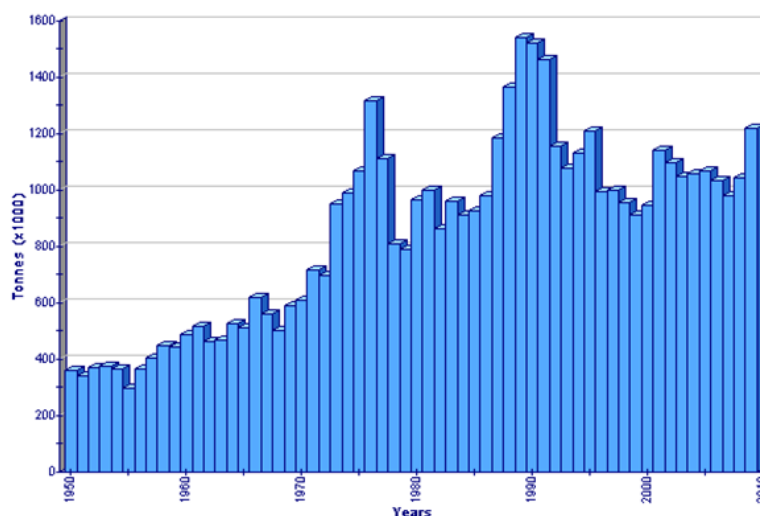


Figura 2 - Capturas globais de *Sardina pilchardus* (FAO Fishery Statistic).

A sardinha é uma espécie rica em ácidos gordos polinsaturados, como os do tipo ómega 3, que são importantes na prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias no Homem (Hull, 2011). No entanto, em certos períodos do ano, tendo em conta o seu baixo conteúdo em gordura, uma fração significativa da sardinha capturada não é usada como um produto fresco para consumo humano. A fim de contribuir para um melhor aproveitamento e valorização desta espécie tem sido estudada, nos últimos anos, a preparação de diversos produtos como por exemplo filetes, produtos fumados, polpas e surimi (Huss, 1997).

Um dos fatores que limitam o seu uso comercial é a dificuldade da sua preservação a baixa temperatura. Assim, a vida de prateleira da sardinha pode ser limitada pela rápida degradação bacteriana e mecanismos de oxidação lipídica, que podem causar odores desagradáveis e a descoloração do músculo (Pestana, 2007).

A frescura é considerada um dos parâmetros mais importantes de qualidade do pescado nos mercados de pescado fresco. A perda de frescura e consequentemente de qualidade depende de muitos fatores incluindo as espécies de peixe, condições de manipulação, temperatura e armazenamento.

Peixes gordos como a sardinha (*Sardina pilchardus*), são particularmente sensíveis às mudanças oxidativas durante o armazenamento, dando origem ao odor a ranço devido ao elevado teor de gordura (3,0 a 25%) e à presença elevada de ácidos gordos polinsaturados. Tal como foi referido anteriormente, estes ácidos gordos polinsaturados são altamente suscetíveis

à oxidação, devido ao número elevado de ligações duplas reativas (Bandarra, *et al.* 1997).

Por outro lado, o tamanho dos peixes pequenos, com uma elevada razão área/volume, é um fator determinante na promoção da deterioração. A elevada taxa metabólica desta espécie, com enzimas que permanecem ativas após a sua morte, causando hidrólise de proteínas, bem como outras alterações, são responsáveis em parte pela rápida deterioração da qualidade. A frescura e a qualidade do peixe cru é geralmente avaliada utilizando uma série de parâmetros físicos, químicos e sensoriais, como a avaliação da formação do aldeído malónico (AM), pelo teste do TBA e/ou pela avaliação da cor recorrendo a um colorímetro (Rodríguez-Casado *et al.*, 2007; Shahidi e Zhong, 2005; Ramirez-Suárez *et al.*, 2000).



Figura 3 - Sardinha (*Sardina pilchardus*) (Fonte própria).

Objetivos

2. Objetivos

Neste trabalho pretende-se produzir e caracterizar a capacidade antioxidante de gelo suplementado com extrato da alga *Fucus spiralis* (Algelo).

Para que este objetivo seja alcançado será fundamental determinar:

1. O potencial antioxidante e a estabilidade dos extratos de *Fucus spiralis*. A capacidade antioxidante será determinada pela Quantificação Total de Polifenóis (QTP) e pela avaliação da capacidade de destoxificação / redução do radical livre DPPH.
2. O efeito do gelo suplementado com extratos de *Fucus spiralis* na evolução do estado oxidativo de pescado fresco (filete de sardinha). O estado oxidativo da sardinha foi determinado pelo índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) e pela avaliação da cor.

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Recolha e preparação de amostras

A alga *Fucus spiralis* foi recolhida na praia Marques Neves e no Portinho da areia norte, Peniche, Portugal durante os meses de janeiro a junho de 2011. As diferentes amostras foram lavadas em laboratório com água destilada, de modo a remover organismos invertebrados, areias, detritos e epífitas. Após a lavagem foram pesadas, embaladas e congeladas em sacos com 100g de alga, a -80 °C (Thermo, Electron Corporation).

3.2. Preparação das extracções

A preparação dos extratos da amostra foi efetuada de acordo com o método adaptado a partir do trabalho de Mayachiew e colaboradores (2008).

Os extratos foram obtidos a partir da trituração da alga e da utilização de solventes polares (Água destilada e etanol (Panreac Química S.A.U., E.U.)). Foram pesados 25g do pó obtido a partir da trituração e colocados num gobelé contendo 100 ml de solvente.

As extracções com diferentes percentagens de solvente foram efetuadas da seguinte forma:

H ₂ O	50 H ₂ O:50 Etanol	25 H ₂ O:75 Etanol	75 H ₂ O:25 Etanol
25g extrato	25g extrato	25g extrato	25g extrato
100 ml H ₂ O	50 ml H ₂ O 50 ml Etanol absoluto	25 ml H ₂ O 75 ml Etanol absoluto	75 ml H ₂ O 25 ml Etanol absoluto

A solução ficou em agitação numa placa (Velp® Scientifica) durante 12 horas, protegida da luz (Fig.4). A mistura foi posteriormente filtrada primeiro com uma gaze para reter as partículas maiores e depois utilizando um filtro nº4 da Whatman. As extracções foram mantidas no frigorífico a uma temperatura de refrigeração de 4°C.



Figura 4 - Preparação de extrações (Fonte própria).

Para a preparação das extrações para a produção de Algelo, procedeu-se do mesmo modo, colocando-se 250g do pó obtido a partir da trituração da alga *Fucus spiralis* em 250 mL de etanol absoluto (Panreac Química S.A.U., E.U.) e 750 ml de H₂O destilada (25% etanol e 75% H₂O destilada).

Para a realização do gelo suplementado, os extratos foram evaporados no rotavapor Laborota 4000 (Heidolph) a 40°C durante 45 minutos, de modo a eliminar o etanol.

3.3. Avaliação da Capacidade Antioxidante

3.3.1. Quantificação Total de Polifenóis (QTP)

A QTP nos extratos de *Fucus spiralis* foi avaliada, através do método de Folin-Ciocalteu adaptado a partir do trabalho realizado por Yu e colaboradores (2002). Este método consiste, normalmente, na utilização de ácido gálico como padrão, para a realização de uma curva de calibração, a qual é utilizada para extrapolação da quantidade de polifenóis existentes nas amostras (Yuan e Walsh, 2006). Os polifenóis constituem um grupo heterogéneo, composto de várias classes de substâncias com capacidade antioxidante (Vargas *et al.*, 2008).

Num microtubo adicionou-se água destilada (790 µl), amostra (10 µl) e Reagente de Folin-Ciocalteu (50µl) (Fluka Biochemika, Sigma, Suíça). Após 2 minutos adicionou-se Na₂CO₃ a 20% (p/v) (150 µl) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A reação foi incubada à temperatura ambiente, no escuro durante 60 minutos após a qual se mediu a absorvância da mesma a um comprimento de onda de 755 nm. O ácido gálico (Sigma, Steinheim, Alemanha) foi usado como padrão para a curva de calibração.

A QTP foi expressa em miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de alga ou miligrama de equivalentes de ácido gálico/ l de solução para preparação de Algelo. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

3.3.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH (Sigma, Steinheim, Alemanha) pelas amostras em estudo foi avaliada a partir da adaptação do método descrito por Duan *et al.* (2006). Este método é um teste espectrofotométrico simples que utiliza o radical livre estável, DPPH, que mimetiza os radicais livres presentes nos organismos (Brand-Williams *et al.*, 1995).

O ensaio baseia-se na elevada capacidade de absorção do DPPH no espectro do visível, num comprimento de onda de 517nm, caracterizados por uma intensa coloração violeta, devido à presença de elétrons livres. A absorção é inibida quando o DPPH se encontra na presença de substâncias capazes de suprimir a ação dos radicais livres, conduzindo a uma descoloração (violeta → amarelo) estequiométrica em relação ao número de moléculas reduzidas do DPPH, independentemente de qualquer atividade enzimática. O grau de descoloração está diretamente relacionado com a supressão da atividade dos radicais livres da substância avaliada no ensaio, verificando-se a sua redução na presença das amostras em estudo.

Preparou-se previamente uma solução de DPPH 0,1 mM em etanol. Num microtubo juntou-se 10 µl de amostra a 990 µl da solução de DPPH, de seguida levou-se ao vórtex (Velp® Scientifica). Posteriormente deixou-se a mistura 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517nm. A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Redução DPPH} = \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{(\text{Abs}_{\text{controlo}})} \times 100$$

Onde:

Abs_{amostra}: absorvância da solução de DPPH (990 µl)+ 10µl de amostra

Abs_{branco}: absorvância da solução do solvente (990 µl)+ 10µl de amostra

Abs_{controlo}: absorvância da solução de DPPH (990 µl)+ 10µl de solvente

Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

3.4. Processamento da sardinha

A sardinha foi adquirida na empresa Profresco – Produtos alimentares, Lda.

A receção das sardinhas foi feita em caixas de esferovite com gelo (Fig. 5 a), seguidamente retirou-se a cabeça, a barbatana caudal e as vísceras (Fig. 5 b). Retiraram-se os filetes com pele, o mais rente possível à coluna vertebral (Fig. 5 c) e foram colocados em tabuleiros com gelo (Fig. e) ou com Algelo (Fig. 5 f). Os tabuleiros possuem um sistema de drenagem para um tabuleiro inferior do gelo que vai descongelando (Fig. 6)

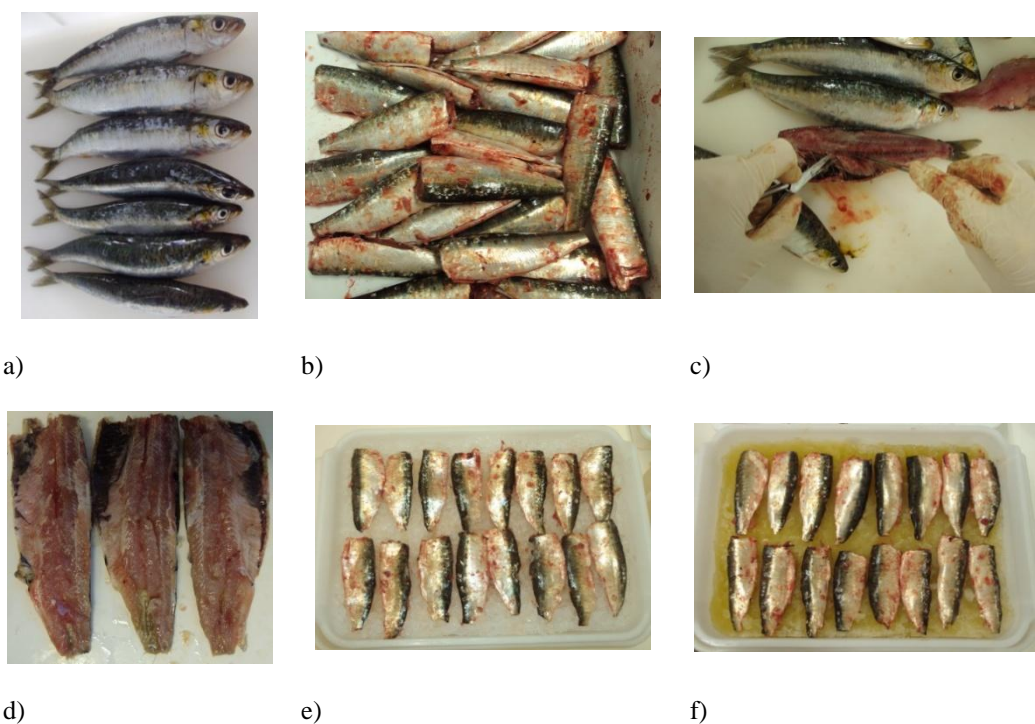


Figura 5 – Processo de obtenção dos filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*) (Fonte própria).

- a) Receção da sardinha
- b) Sardinha sem cabeça, barbatana caudal vísceras
- c) Obtenção de filetes de sardinha
- d) Sardinha em filetes
- e) Sardinha em tabuleiro com gelo
- f) Sardinha em tabuleiro com ALGELO



Figura 6 – Tabuleiros com sistema de drenagem de água (Fonte própria).

3.5. Avaliação da cor da sardinha

Outro método utilizado foi o método colorimétrico onde se medem os parâmetros de cor efetuados com o colorímetro. A cor é uma das principais características organolépticas usadas para estabelecer a qualidade e aceitabilidade de produtos alimentares. As coordenadas de cor L^* , a^* e b^* do sistema CIELAB são utilizadas para medir o grau de luminosidade (L), avermelhado (+ a), e amarelado (+ b) (Ramirez-Suárez *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi efetuada a medição dos parâmetros de cor L^* e a^* (sistema CIELAB) da amostra com o auxílio do colorímetro (Chroma meter CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc.). Foram feitas três medições em cada amostra (Fig.7).

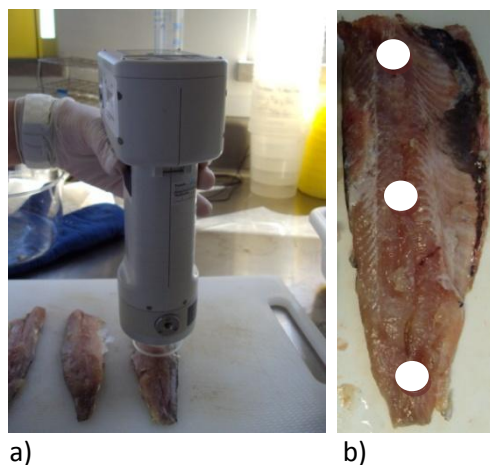


Figura 7 – a) Medição dos parâmetros de cor L^* e a^* em filetes de sardinha com o auxílio do colorímetro; b) Pontos de medição dos parâmetros de cor. (Fonte própria)

3.6. Teor de humidade

Para a determinação do índice do ácido tiobarbitúrico é necessário introduzir na fórmula de cálculo a percentagem de humidade da amostra, para tal a humidade das amostras foi medida no analisador de humidade (Mettler Toledo HB 43 Halogen), utilizando 0,5 g de cada amostra (Fig.8). O teor de humidade foi expresso em percentagem.

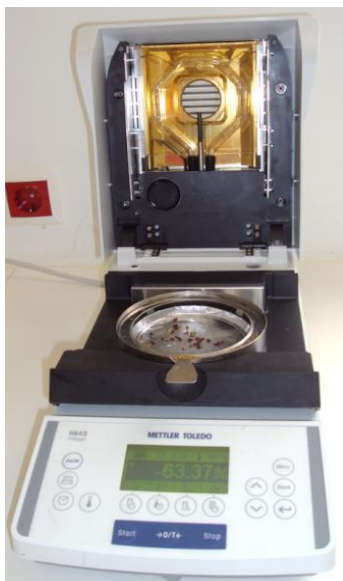


Figura 8 – Analisador de humidade (Fonte própria).

3.7. Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)

Este método químico, o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), é amplamente utilizado para detetar a oxidação lipídica em alimentos contendo gorduras.

Durante a oxidação lipídica, o aldeído malónico (AM), um componente secundário dos ácidos gordos com três ou mais ligações duplas, é formado como resultado da degradação de ácidos gordos polinsaturados. É normalmente utilizado como indicador do processo de oxidação lipídica.

Neste ensaio o AM reage com o TBA formando um complexo corado rosa AM-TBA, que pode ser medido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 530 nm. O valor de TBA é expresso em miligramas de AM/1000g da amostra. No entanto, os alcenos e os alcadienos também reagem com o TBA, produzindo cor rosa, assim o termo AM é agora substituído por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Shahidi e Zhong, 2005).

A Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico nas amostras em estudo (filetes de sardinha) foi avaliada a partir da adaptação da NP 3356:2009.

A preparação da amostra foi efetuada a partir da NP 4424:2004. Homogeneizou-se a amostra passando três vezes pela máquina de picar. Pesou-se cerca de 15g de amostra. Adicionou-se 30 ml da solução de ácido tricloroacético (Scharlau, Espanha), homogeneizou-se e realizou-se a extração com agitação durante dois minutos.

Filtrou-se o extrato (filtro Whatman 4, Reino Unido) para balão cônico.

Para a determinação pipetou-se para tubo de ensaio, 100µl a 5 ml de extrato, conforme o teor de aldeído malónico esperado e perpez-se o volume a 5 ml com a solução de ácido tricloroacético. Adicionou-se 5 ml da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck, Alemanha) rolhou-se os tubos e colocou-se em banho de água fervente durante 40 min. Retirou-se e deixou-se arrefecer em água e agitou-se com cuidado abrindo ligeiramente a rolha. Transferiu-se o conteúdo de cada tubo para as células do espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Helios α) e registou-se a absorvância a um comprimento de onda de 530 nm contra ensaio em branco. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

Traçou-se a curva de referência a partir da solução de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (TEP) (Acros Organics, E.U.A.) para as concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 µmol/ml de aldeído malónico.

O índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) foi expresso em miligramas de aldeído malónico por 1000g da amostra, utilizando a seguinte equação:

$$\frac{72 \times c}{m \times v} \times \left(30 + \frac{m \times H}{100} \right)$$

Onde:

c - a concentração de aldeído malónico, expresso em micromoles;

v - o volume , expresso em mililitros, do extrato;

H - a humidade da amostra, expressa em percentagem;

m - a massa, expressa em grama, da toma do ensaio.

3.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados através do teste t-student ou através do teste de análise de variância com 1 fator (ANOVA-1 fator), seguido pelo teste de Dunnett (Zar, 2010) para comparações com o tempo 0 ou controlo, ou seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas (Zar, 2010). Para as condições indicadas nas figuras, os resultados representam as médias \pm Erro padrão da média (SEM).

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância α de 0,05.

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização do processo de extração e da estabilidade antioxidante dos extratos de *Fucus spiralis* antes e após a produção do gelo suplementado

De modo a perceber qual a melhor extração para utilizar na produção de Algelo, tal como referido na secção anterior, realizaram-se quatro diferentes extrações, variando a razão H₂O/etanol. A capacidade antioxidante dos extratos resultantes de cada uma das referidas extrações foi avaliada através de dois métodos: A Quantidade Total de Polifenóis e a capacidade de redução do radical DPPH.

A quantificação total de polifenóis das quatro extrações em estudo foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu. Os resultados encontram-se apresentados na figura 9 em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de alga (mg EAG/g).

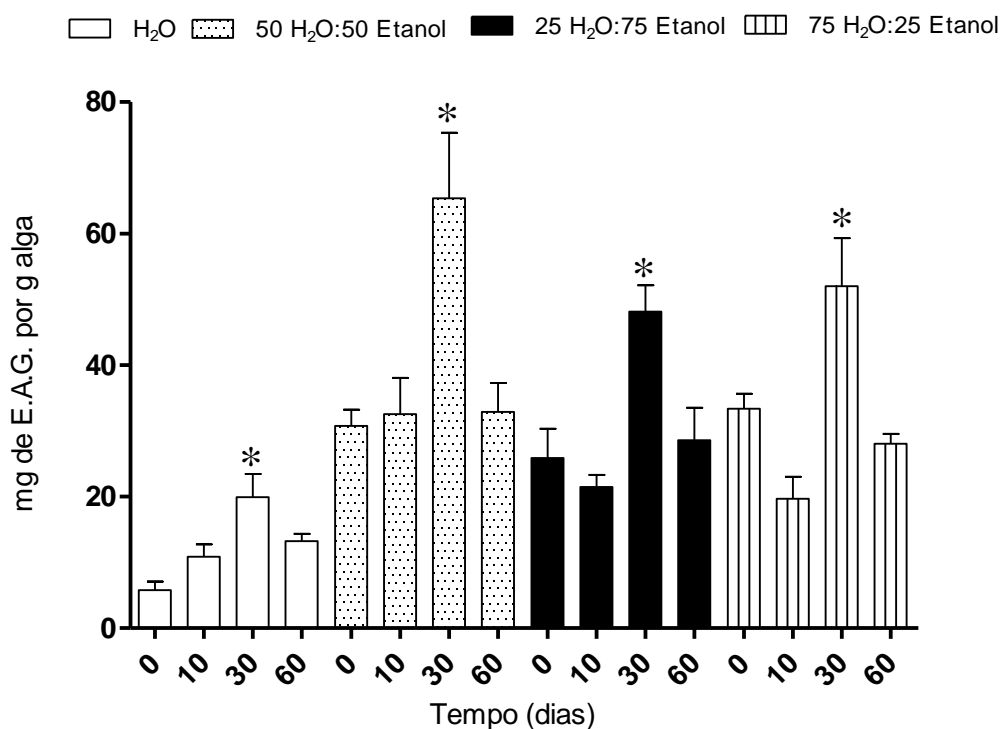


Figura 9 - Quantidade Total de Polifenóis (QTP) em mg EAG/g de alga (peso seco), nas diferentes extrações da alga *Fucus spiralis*. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=6). *p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo 0.

Tal como pode ser observado, a QTP para todas as extrações é constante ao longo do tempo, ocorrendo apenas registos mais elevados para todas as extrações ao fim de 30 dias. A extração menos eficaz foi a extração com H₂O, todas as outras tiveram valores de QTP iniciais de, aproximadamente, 30 mg EAG/g .

Tal como foi anteriormente referido o DPPH é um radical livre estável, podendo ser reduzido por moléculas antioxidantes. Este ensaio baseia-se na capacidade de moléculas antioxidantes funcionarem como dadores de hidrogénios ou redutores de radicais livres (Chew *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). A capacidade de redução do radical DPPH demonstrada pelas quatro diferentes extrações da alga *Fucus spiralis* em estudo encontra-se representada na figura 10.

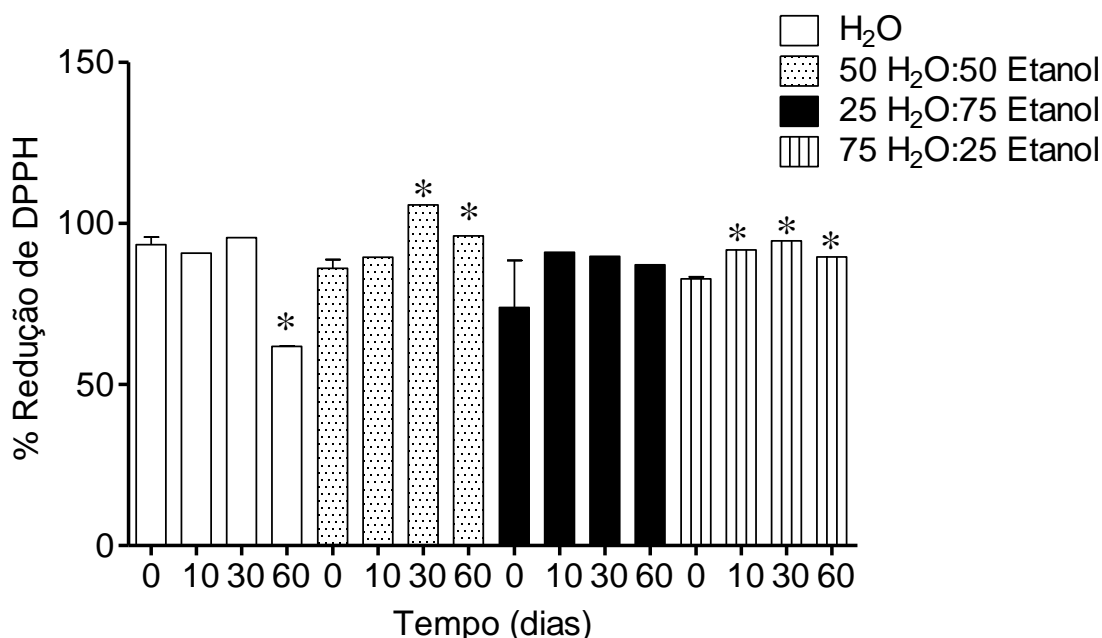


Figura 10 – Capacidade de redução do radical DPPH nas diferentes extrações da alga *Fucus spiralis*. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=3). *p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo 0.

Como podemos observar a capacidade de redução do radical livre DPPH mantém-se estável no geral das extrações ao longo de 60 dias. Apenas para a extração feita com H₂O existe uma diminuição acentuada da % de redução de 30 para 60 dias, $95,638 \pm 0,004\%$ e $61,872 \pm 0,0829\%$ respetivamente.

De acordo com os resultados obtidos tanto para a QTP e para o DPPH, a extração escolhida para ser utilizada na produção de Algelo foi a extração 75 H₂O:25 Etanol, porque apesar da capacidade antioxidante encontrada noutras extrações ser semelhante, esta é a extração em que se utiliza menor quantidade de etanol.

Uma vez encontrada a extração que reúne as melhores condições, como a melhor capacidade antioxidante e estabilidade dessa mesma capacidade ao longo do tempo, procedeu-se à produção do Algelo (gelo suplementado com extratos de algas com capacidade antioxidante). Depois da sua produção fez-se a caracterização da capacidade antioxidante e estabilidade ao longo do tempo.

4.2. Caracterização da estabilidade oxidativa dos extratos de *Fucus spiralis* antes e após a produção do gelo suplementado

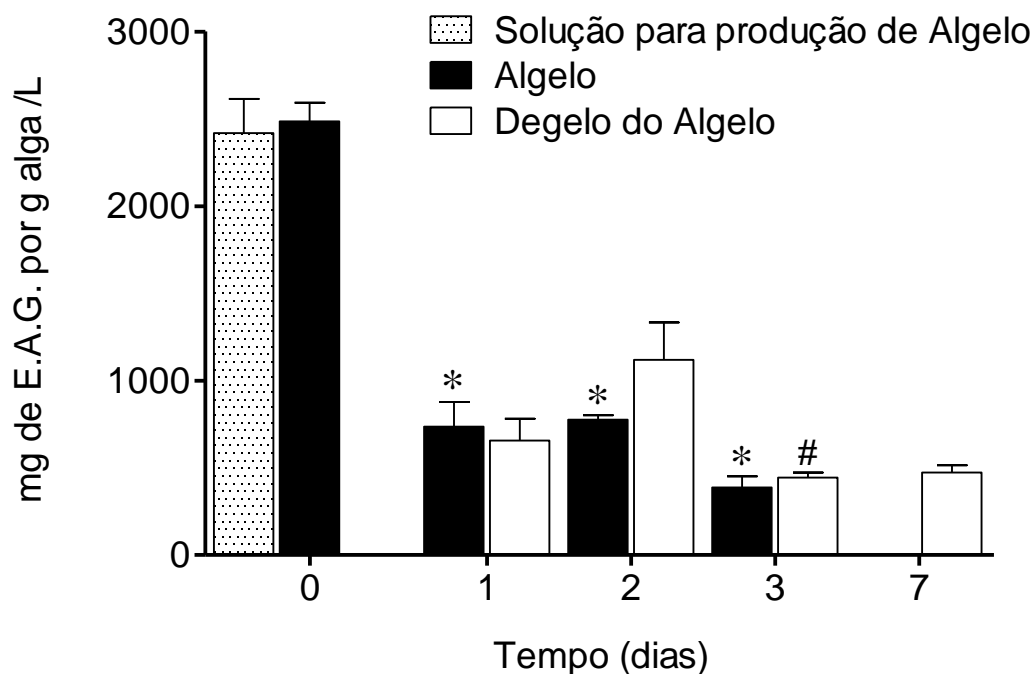


Figura 11 - Quantidade Total de Polifenóis (QTP) em mg EAG/L, na solução de preparação do Algelo, no Algelo e na água de descongelação ao longo do tempo (7 dias), a 4°C. Os valores correspondem à média ± Erro padrão da média (SEM) (n=3). * p< 0,05 representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo 0. # p<0,05 representa diferenças entre o dia 3 e o dia 2.

A solução de preparação do Algelo, quando preparada, apresenta uma QTP de $2419,167 \pm 195$ mg EAG/L, valor semelhante ao determinado no Algelo, QTP de $2485,000 \pm 108,187$ mg EAG/L (tempo 0), não ocorrendo perdas da capacidade oxidante no processo de produção do Algelo.

Ao fim de 24h o Algelo apresenta uma QTP semelhante à da água de descongelação, $735,939 \pm 141,075$ mg EAG/L e $656,436 \pm 124,091$ mg EAG/L respetivamente. Este facto mantém-se até às 72h, apesar de existir uma diminuição na QTP para a água de descongelação ($443,831 \pm 28,532$ mg EAG/L), quando comparada com o dia 2. Ao fim de 7 dias o Algelo, se não houver reposição, tende a descongelar na totalidade, ficando apenas com a água de descongelação que mantém a sua QTP ($742,858 \pm 42,104$ mg EAG/L).

Na figura seguinte (Fig. 12) podemos observar a % de redução do DPPH ao longo de 7 dias. A solução para produção do Algelo apresenta uma % de redução de $56,835 \pm 0,001$, que foi semelhante à do Algelo, este apresenta uma % de redução de $63,070 \pm 3,078$. O Algelo começa a descongelar às 24h (dia 1), podendo medir-se a % de redução do DPPH também na água de degelo. No dia 1 a percentagem de redução do DPPH é superior na água de congelação ($59,793 \pm 3,114\%$) em relação ao Algelo ($34,685 \pm 2,433\%$). O mesmo acontece nos restantes dias, podendo verificar-se uma diminuição gradual da % de redução do DPPH pelo Algelo ao longo dos 7 dias. A % de redução do DPPH por parte da água de degelo diminui ligeiramente ao 2 e 3º dia.

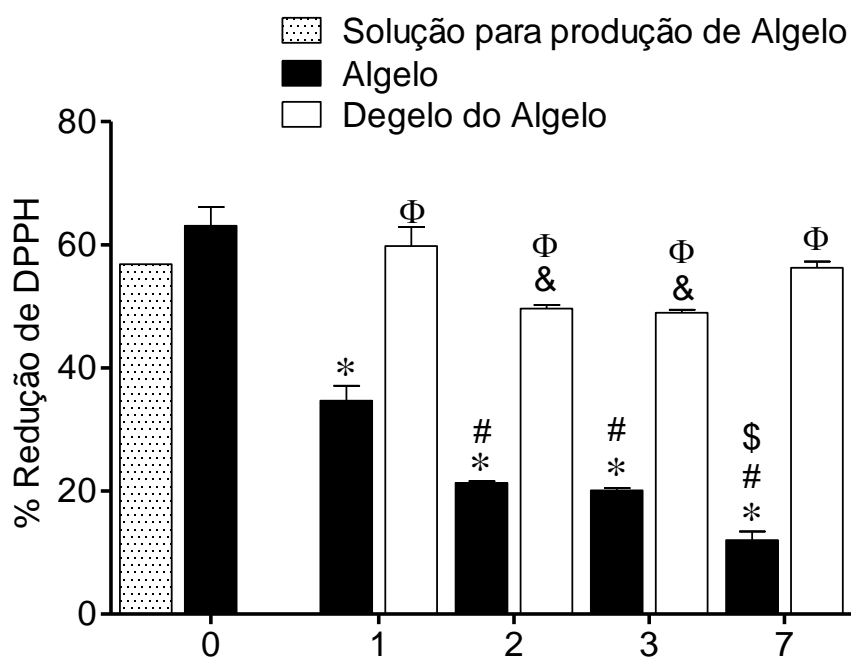


Figura 12 – Capacidade de redução do radical DPPH no Algelo e na água de descongelação, armazenado durante 7 dias, a 4°C. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=3). * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo 0. # $p < 0,05$ representa diferenças entre o dia 2, 3 e 7 quando comparados com o dia 1. \$ $p < 0,05$ representa diferenças entre o dia 2 e 3 quando comparados com o dia 7. & $p < 0,05$ representa diferenças entre o dia 2 e 3 quando comparados com o dia 1. Φ $p < 0,05$ representa diferenças entre Algelo e degelo do Algelo.

4.3. Avaliação da estabilidade oxidativa da sardinha na presença de gelo suplementado com extratos de *Fucus spiralis*

Após a produção de Algelo e a caracterização da sua capacidade antioxidante e estabilidade ao longo do tempo, determinou-se o índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) em filetes de sardinha armazenados em gelo (controlo) e em Algelo para testar a capacidade do Algelo retardar ou inibir a oxidação lipídica em pescado fresco.

A Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico nas amostras em estudo (filetes de sardinha) foi avaliada a partir da adaptação da NP 3356:2009, tal como referido na secção de material e métodos. Neste método é feita a extração do aldeído malónico com uma mistura de ácido tricloroacético, galato de propilo e EDTA. A reação do aldeído malónico com o ácido tiobarbitúrico, forma um complexo corado rosa. A medição da absorvância em espectrofotómetro é lida a um comprimento de onda de 530 nm, contra ensaio em branco. Os resultados do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) da amostra em estudo, filetes de sardinha, armazenadas em gelo (controlo) durante 2 semanas à temperatura de refrigeração de 4°C encontram-se representados na figura 13.

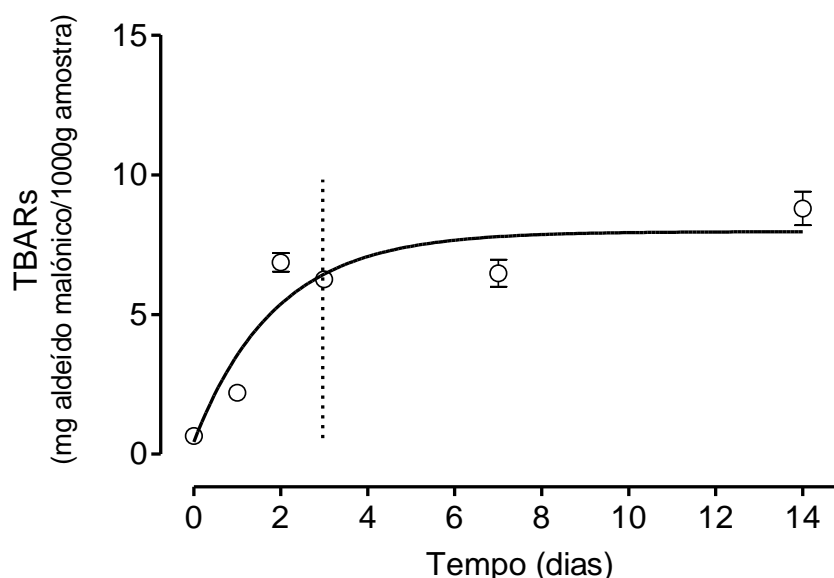


Figura 13 – Índice do ácido tiobarbitúrico para filetes de sardinha armazenados em gelo durante 14 dias a 4°C. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=3).

De acordo com a observação da figura 13 verifica-se que o Índice do ácido tiobarbitúrico para filetes de sardinha ao tempo inicial é de $0,647 \pm 0,041$ mg AM/1000g, que aumenta exponencialmente até às 48h, estabilizando depois e atingindo o seu máximo aos 14 dias ($8,795 \pm 0,605$ mg AM/1000g).

Para avaliar a variação de cor ao longo do tempo de armazenamento em gelo dos filetes de sardinha, foi determinado a parâmetro de cor a^* e L, tal como descrito na secção dos métodos. Os resultados de variação do valor de a^* encontram-se na figura 14.

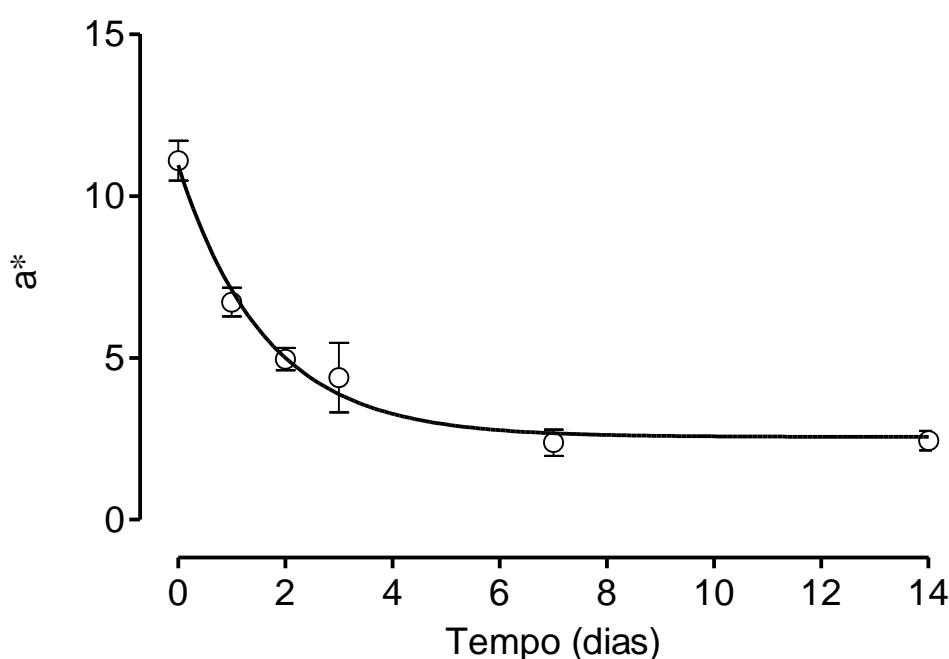


Figura 14 – Parâmetro de cor a^* , medido em filetes de sardinha armazenados em gelo durante 14 dias a 4°C. Os símbolos correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) entre 4 e 7 experiências independentes ($n=3$).

De acordo com a figura 14, onde se encontram os valores do parâmetro a^* ao longo de 14 dias, pode-se verificar que o valor do a^* diminui ao longo do tempo, denotando-se uma diminuição mais acentuada até às 72h. Começando com valores no dia 0 de $11,090 \pm 0,618$ e decrescendo até valores de $2,440 \pm 0,301$ ao fim de 14 dias. O que indica que a amostra está a perder a cor vermelha ao longo do tempo.

Em relação ao valor L, pode-se observar (Fig. 15) um ligeiro aumento no valor de L^* até às 48h, estabilizando posteriormente até ao dia 14.

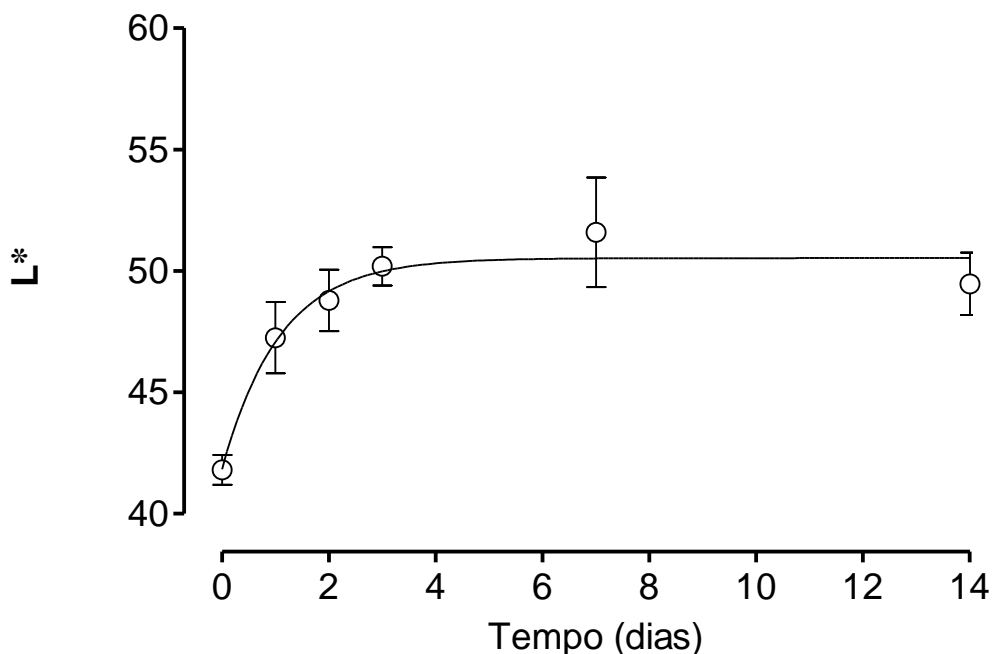


Figura 15 – Parâmetro de cor L^* , medido em filetes de sardinha armazenados em gelo durante 14 dias a 4°C . Os símbolos correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) entre 4 e 7 experiências independentes.

Pela análise da evolução do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA), da variação de a^* e da variação de L^* , decidiu-se avaliar o efeito do gelo suplementado com extrato de *Fucus spiralis*, na estabilidade oxidativa de filetes de sardinha, até às 72h. Inicialmente preparou-se uma solução de extrato de *Fucus spiralis* à concentração de 100 mg eq. ácido gálico/l. Os resultados referentes à evolução do TBA dos filetes de sardinha na presença e na ausência de Algelo durante 72h, à temperatura de refrigeração de 4°C , encontram-se representados na figura 16. Tal como se pode observar existe um aumento até às 48 do TBA, sendo semelhante na presença e na ausência de Algelo. Das 48 para as 72 horas houve uma “aparente” diminuição do TBA, facto que foi verificado em ambas as situações.

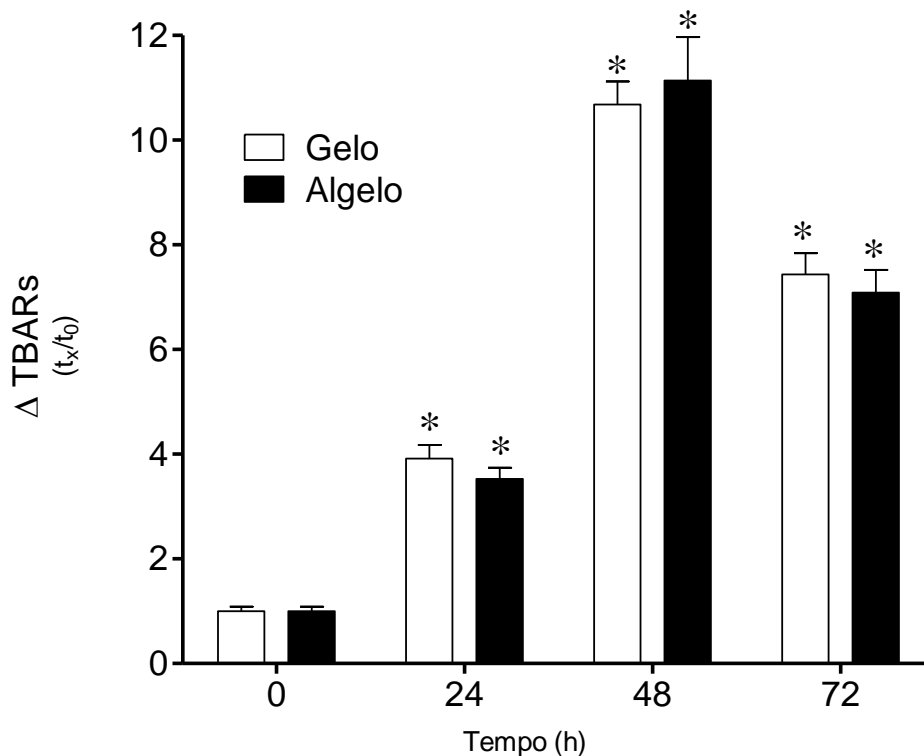


Figura 16 - Índice do ácido tiobarbitúrico para filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (100mg de equivalentes de ácido gálico/l) durante 72h a 4°C. Os valores correspondem à média da razão $t_x/t_0 \pm$ Erro padrão da média (SEM) (n=3). * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo anterior.

Os resultados referentes à variação do parâmetro L^* encontram-se representados na figura 17. Tal como se pode facilmente verificar, existe um aumento substancial dos valores de L^* nas primeiras 24h. Após este período existe apenas um aumento tendencial, não existindo diferenças na luminosidade do filete na presença ou na ausência do gelo suplementado com extratos de *Fucus spiralis*.

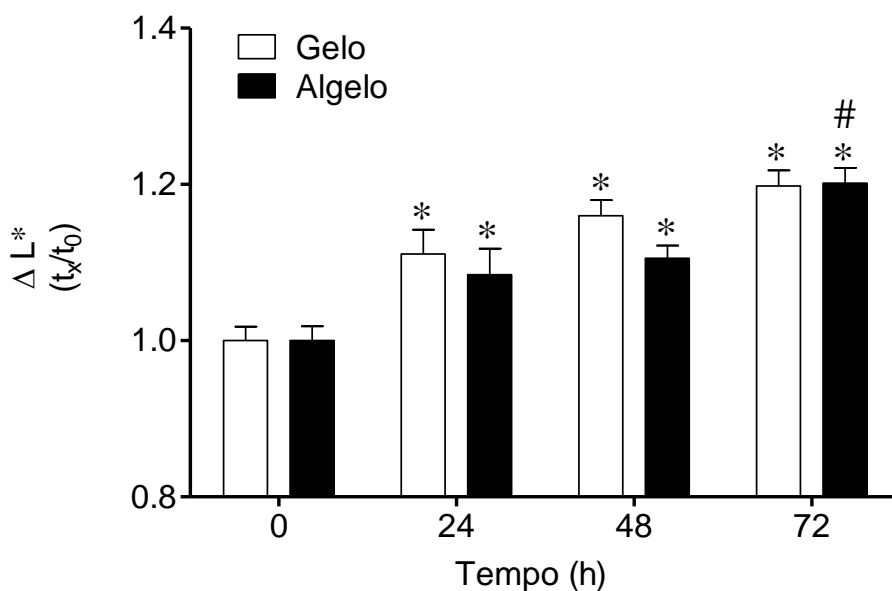


Figura 17 –Parâmetro de cor L^* , medido em filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (100mg de eq. de ácido gálico/l) durante 14 dias a 4°C. Os valores correspondem à média da razão $t_x/t_0 \pm$ Erro padrão da média (SEM) (n=3). * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo 0. # $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo anterior.

O valor do parâmetro a^* medido em filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (100 mg de eq. ácido gálico /l) durante 72h encontram-se na figura 19). Existe uma diminuição dos valores de a^* ao longo do tempo para os filetes armazenados em gelo e em Algelo, não existindo diferenças entre gelo e Algelo.

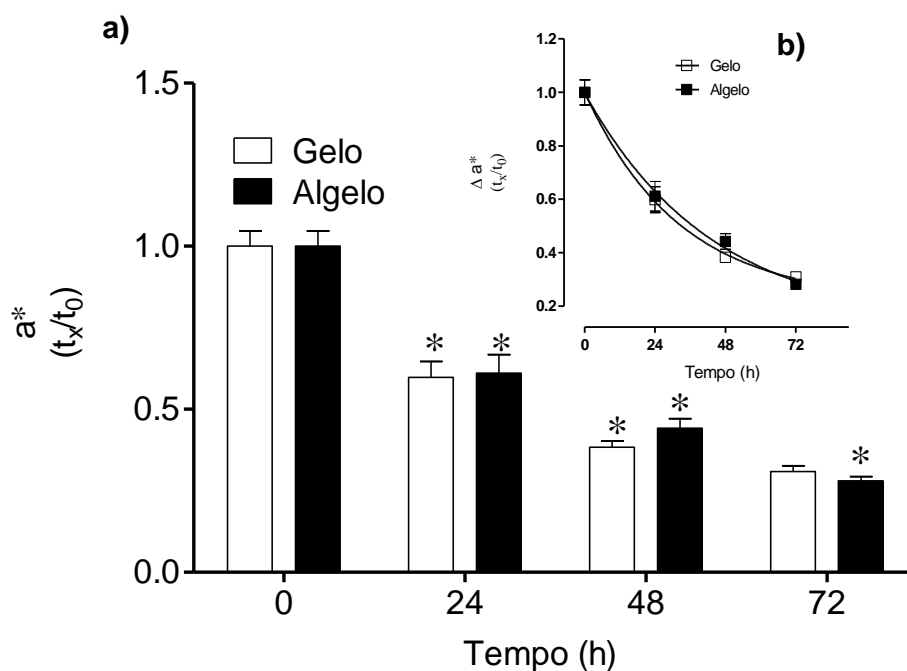


Figura 18 – Parâmetro de cor a^* , medido em filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algel (100mg de eq. de ácido gálico/l) durante 14 dias a 4°C (a). O inset (b) representa o perfil de variação de a^* ao longo do tempo. Os valores correspondem à média da razão $t_x/t_0 \pm$ Erro padrão da média (SEM) ($n=3$). * $p<0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo anterior.

Finalmente, decidiu-se utilizar uma solução de extratos de *Fucus spiralis* mais concentrada (500 mg eq. ácido gálico/l) para avaliar a estabilidade oxidativa dos filetes de sardinha. De um modo geral, o índice do TBA para os filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algel (500 mg/L) aumenta ao longo de 72h (figura 19). No entanto, às 48 h existem diferenças consideráveis na oxidação lipídica na presença de gelo e Algel, com aumentos de 19 vezes e 12,5 vezes em relação ao índice de TBA ao tempo 0, respetivamente.

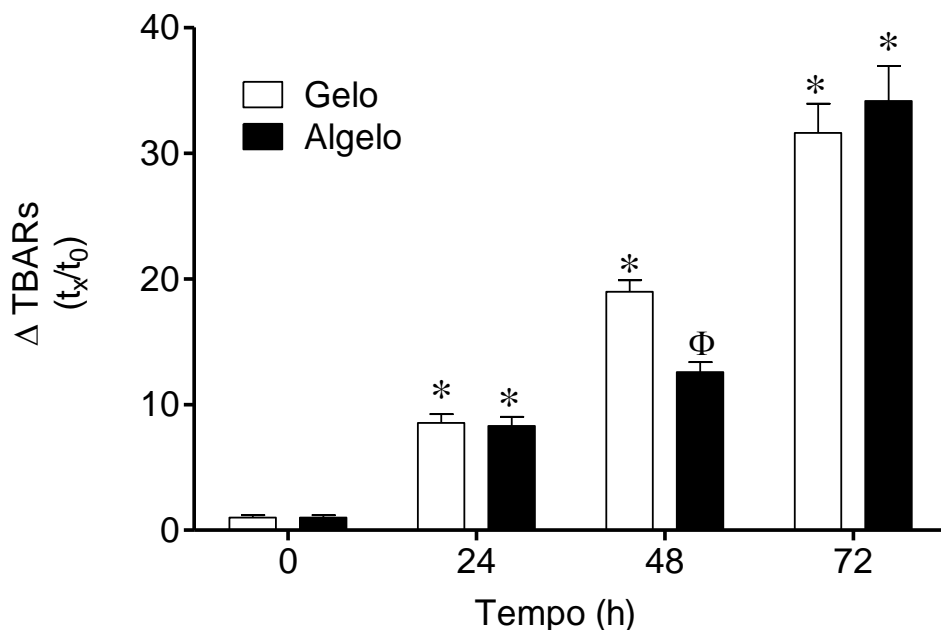


Figura 19 - Índice do ácido tiobarbitúrico para filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo durante 72h a 4°C. Algelo a uma concentração de 500 mg de eq. de ácido gálico/l. Os valores correspondem à média da razão $t_x/t_0 \pm$ Erro padrão da média (SEM) (n=3). * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo anterior. $\Phi p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas entre gelo e Algelo.

Pela análise da figura 20, pode-se verificar que os valores de L^* aumentam até às 48h, sendo a variação de L^* medidos em filetes de sardinha armazenados em Algelo ($1,203 \pm 0,001$) ligeiramente superiores aos observados na presença de gelo ($1,100 \pm 0,020$) às 24h.

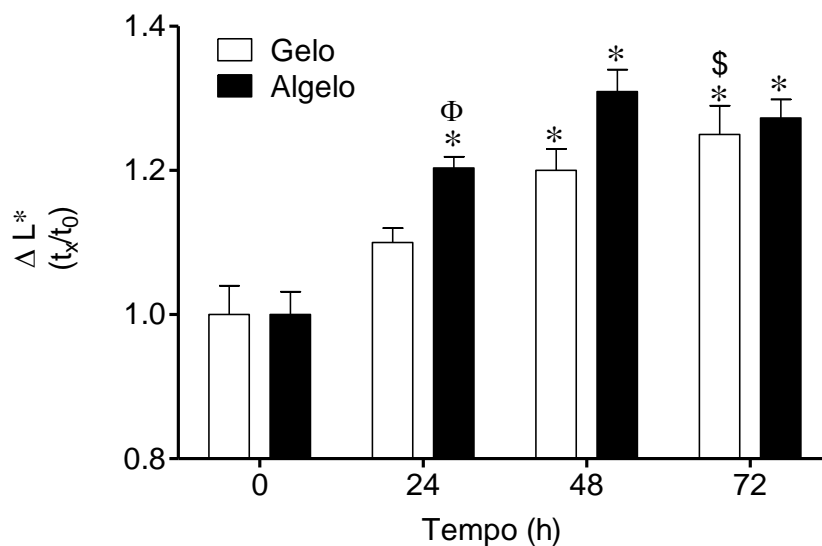


Figura 20 – Parâmetro de cor L^* , medido em filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (500 mg de eq. ácido gálico/l) durante 14 dias a 4°C. Os valores correspondem à média da razão $t_x/t_0 \pm$ Erro padrão da média (SEM) ($n=3$). * $p<0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo anterior. $\Phi p<0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas entre gelo e Algelo. \$ $p<0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas entre as 72 e as 24h.

O valor do parâmetro a^* medido em filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo durante 14 dias encontra-se na figura 21. Os valores de a^* para os filetes armazenados em gelo e em Algelo, diminuem ao longo do tempo, com particulares variações até às 24h. Apesar de não encontramos diferenças entre gelo e Algelo na cor vermelha dos filetes de sardinha, é possível verificar pela análise do *inset* (figura 21b) que existe uma tendência para o Algelo diminuir a redução da cor vermelha.

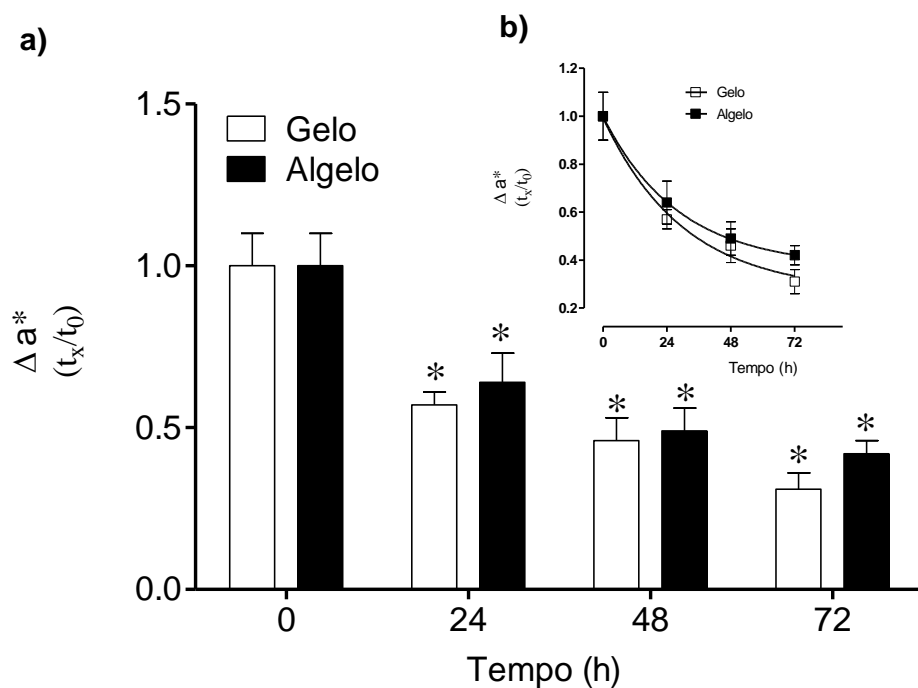


Figura 21 – Parâmetro de cor a^* , medido em filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (500mg de eq. ácido galico/l) durante 14 dias a 4°C (b). O *inset* (b) representa o perfil de variação de a^* ao longo do tempo. Os valores correspondem à média da razão $t_x/t_0 \pm$ Erro padrão da média (SEM) (n=3). * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o tempo 0.

Discussão e Conclusão

5. Discussão e Conclusão

A alga *Fucus spiralis* pertence ao filo Heterokontophyta (algas castanhas) e à ordem Fucales. É uma espécie perene, comum no patamar médio litoral formando faixas nítidas nalgumas zonas rochosas costeiras como é exemplo da costa de Peniche. Esta passa 90% do tempo fora de água, está sujeita a suportar condições extremas de dessecação, salinidade, radiação UV, herbívoros, patógenos e epífitas (Salvador *et al.*, 2007; Plaza, *et al.*, 2008; Audibert *et al.*, 2010). Como defesa a estas pressões ecológicas muitos organismos marinhos produzem moléculas bioativas. Em particular as feofíceas produzem compostos fenólicos, estes são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e pela sua participação em reações redox e são utilizados pelo seu potencial de sequestrar radicais e pelas suas propriedades antienvhecimento estão também envolvidos nos mecanismos de fotoproteção, sobretudo para contrariar os efeitos citotóxicos da radiação UV. Segundo Audibert e colaboradores (2010) as feofíceas apresentam elevados níveis de florotaninas. Devido à produção destas moléculas bioativas, a alga *Fucus spiralis* consegue sobreviver à perda de 70-80 por cento de água. De acordo com anteriores trabalhos do nosso grupo (Pinteus *et al.*, 2009) esta espécie apresentou um elevado potencial antioxidante tanto na Quantificação total de Polifenóis como na capacidade de redução do radical livre do DPPH, facto que foi confirmado na realização deste trabalho. No trabalho de Pinteus e colaboradores (2009), esta foi, das algas estudadas, a alga com maior potencial antioxidante. Esta elevada capacidade antioxidante das algas castanhas não é surpreendente, já que a alga *Padina antillarum*, representativa da classe das algas castanhas (Feofíceas), apresentou também a maior QTP no trabalho apresentado por Chew e colaboradores (2008).

De acordo com estes dados e por ser uma alga edível a *Fucus spiralis* foi a escolhida para a produção de Algelo.

Foram realizadas quatro extrações com solventes polares a H₂O e o Etanol em diferentes proporções (H₂O, 50 H₂O:50 Etanol, 25 H₂O:75 Etanol e 75 H₂O:25 Etanol), para seleccionar qual a que teria melhor rendimento na extração de moléculas com capacidade antioxidante. De acordo com Koivikko (2008) a polaridade do solvente de extração bem como a solubilidade dos compostos de interesse têm um efeito crítico sobre o rendimento de extração dos polifenóis. Os compostos fenólicos são geralmente facilmente solúveis em extratores menos polares que a água. A extração de diferentes

fenóis a partir de material vegetal, neste caso nas algas, exige diferentes extratores com diferentes polaridades, sendo as misturas de água, metanol, etanol ou acetona as mais utilizadas. Segundo Jokić e colaboradores (2010), que extraíram polifenóis de material vegetal, grãos de soja, a temperatura, solvente e tempo de extração, influenciam o rendimento de extração de polifenóis totais. No caso anterior, estes autores obtiveram o maior rendimento de extração de polifenóis totais quando utilizaram 50% etanol:50% H₂O. Por outro lado, Koffi e colaboradores (2010) relatam que os melhores solventes para a extração de polifenóis são as misturas entre etanol/água e acetona/água, em comparação com o etanol e a acetona individualmente. No trabalho realizado por Dai e Mumper (2010), solventes tais como o metanol, etanol, acetona, acetato de etilo e as suas combinações têm sido usados para a extração de compostos fenólicos de origem vegetal, com diferentes proporções de água, afetando diretamente a quantidade e o rendimento de polifenóis extraídos. Neste trabalho é também referido que o etanol é um bom solvente para a extração de polifenóis e é seguro para consumo humano, o que corrobora a utilização para a extração e consequente produção de Algelo. No nosso trabalho todas as extrações (H₂O, 50 H₂O:50 Etanol, 25 H₂O:75 Etanol e 75 H₂O:25 Etanol) foram eficientes. No entanto, a extração de polifenóis foi mais eficaz quando houve mistura de solventes H₂O e Etanol, não existindo diferenças entre estas. Deste modo foi escolhida a solução de extração com menor percentagem de etanol testada, a 75 H₂O:25 Etanol, para a produção de Algelo. A capacidade antioxidante dos extratos da *Fucus spiralis*, mantido a 4°C, parecem ser estáveis até aos 60 dias, tempo máximo que foi estudado. Existem estudos que reportam a existência de uma correlação positiva entre a QTP e o DPPH, quando a QTP é elevada é de esperar que a capacidade de redução do radical livre DPPH também seja elevada (Matsukawa *et al.*, 1997). Estes resultados são corroborados pelo estudo de Amsler e Fairhead (2006) que reportam que as florotaninas que estão presentes nas algas castanhas como a *Fucus* e que possuem características polares.

Em relação à QTP do Algelo, verifica-se que não existem perdas da capacidade antioxidante no processo de produção do Algelo, pois a QTP da solução de produção (solução líquida) foi igual à do Algelo. Este facto é muito importante no processo de produção pois mantém o rendimento, e não se tem que partir duma concentração muito elevada para conseguir ter uma determinada concentração de polifenóis no Algelo, já que não existem perdas. No entanto, ao fim de 24 horas já existe uma perda da capacidade antioxidantes (QTP) de, aproximadamente, 80%.

De acordo com os resultados obtidos para a capacidade de redução do radical livre DPPH para o Algelo, verifica-se que a partir das 24h a capacidade de redução do radical livre DPPH para a água de descongelação é superior à do Algelo. Na realidade ao fim do 7º dia o Algelo só possui 20% da capacidade antioxidante (redução do DPPH) existente inicialmente. Tudo isto aponta para que o Algelo não estar a conseguir reter os polifenóis e outras moléculas antioxidantes, que estão a perder-se com a água de descongelação.

A Sardinha (*Sardina pilchardus*) é um pequeno pelágico que pela sua abundância, assume grande importância no setor Português da pesca.

De acordo com Bandarra e colaboradores (2001) a sardinha constitui um bom exemplo de uma espécie cujo teor em gordura está sujeito a variações sazonais apreciáveis (com um mínimo de 1,2% em Março-Abril e um máximo de 18,4% em Setembro-Outubro). A peroxidação lipídica manifesta-se mais, quanto maior for o seu conteúdo em lípidos (Pereira *et al.*, 2005). Os resultados referentes ao índice TBA, para filetes de sardinha armazenados em gelo a 4°C, demonstraram grande aumento da oxidação até às 48h, em que os valores aumentaram 10 vezes, quando comparados com o valor inicial. Os valores obtidos estão de acordo com Aubourg e colaboradores (1997) que observaram para a *Sardina pilchardus*, armazenada a 0°C teores de 2,04; 6,43; 8,03 e 4,70 mg AM/Kg, para os períodos de 1, 3, 9 e 16 dias, respetivamente. Estes valores comparam bem com os valores por nós obtidos para 1, 3 e 7 dias que foram $2,193 \pm 0,122$ mg AM/1000g, $6,260 \pm 0,244$ mg AM/1000g e $6,477 \pm 0,480$ mg AM/1000g, respetivamente.

Pelo contrário, Simeonidou e colaboradores (1998) detetaram até 18,32 mg de AM/kg na sardinha *Sardine mediterraneus* armazenada em gelo durante 6 dias. Do dia 3 ($9,02 \pm 0,07$ mg AM/Kg) para o dia 6 ($18,32 \pm 0,09$ mg AM/Kg) ocorreu um aumento significativo em relação ao primeiro dia ($2,46 \pm 0,07$ mg AM/Kg). Pacheco-Aguilar e colaboradores (2000), encontraram o valor de 35 mg de AM/kg na sardinha *Sardinops sagax caerulea*, após 11 dias. Tudo isto aponta para valores de TBA que variam com a espécie de sardinha, mas também para diferentes % de gordura que a sardinha pode apresentar ao longo do ano.

Tem sido referido que o valor máximo de TBA, indicando boa qualidade de peixes congelados, refrigerados ou armazenados em gelo é de 5 mg AM/Kg, enquanto

que os peixes podem ser consumidos até um nível de 8 AM/Kg em valores de índice de TBA (Kilinc *et al.*, 2004).

De um modo geral, o índice do TBA para os filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (100 e 500 mg de eq. ácido gálico /l) aumenta ao longo das primeiras 72h. No entanto, às 48h o índice de TBA para os filetes armazenados em Algelo (500 mg eq. ácido gálico/l) é inferior, quando comparado com os filetes de sardinha armazenados em gelo. Estes resultados positivos para os filetes armazenados em Algelo devem-se, certamente, à capacidade antioxidante dada pela alga *Fucus spiralis* que suplementa o Algelo, retardando assim a oxidação lipídica em relação aos valores obtidos para o controlo (gelo). O facto de só termos efeito às 48h poderá estar relacionado com a perda de capacidade antioxidante do Algelo para a água de degelo. Na realidade nós observamos uma maior concentração de polifenóis na água de descongelação do que no Algelo. Esta ideia foi confirmada pela capacidade de redução do radical livre DPPH, pois às 48h a capacidade é também superior para a água de descongelação.

A taxa de deterioração de peixes depende da espécie, da flora microbiana inicial, do local da captura, do conteúdo da captura, do processamento e do método de armazenamento. Esta deterioração é realizada muitas vezes pela análise das variações de cor. Para a avaliação dos parâmetros de cor nos filetes foi utilizado o sistema CIELab, pois hoje em dia é um método amplamente utilizado e de elevada aceitação, uma vez que é o mais indicativo da perceção sensorial (Alonso-Salces *et al.*, 2005).

Os valores do parâmetro a^* medido tanto nos filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo nas concentrações de 100mg/L e 500mg/l, decrescem gradualmente até às 72h, não existindo diferenças significantes entre gelo e Algelo. Esta diminuição do valor de a^* era já esperada, já que tal facto indica-nos que a amostra está a perder a cor vermelha ao longo do tempo. Segundo Chaijan e colaboradores (2005) a mioglobina tem sido conhecida por ser um dos principais contribuintes para a cor do músculo, dependendo dos seus derivados e da concentração. A hemoglobina é perdida muito facilmente durante o manuseio e armazenamento, enquanto que a mioglobina é retida pela estrutura do músculo intracelular. Por isso, a mudança de cor do músculo é principalmente devido à reação da mioglobina com outros compostos do músculo, especialmente com as proteínas miofibrilares. Durante o manuseio e armazenamento do pescado, ocorrem mudanças a nível bioquímico, químico e microbiológico, levando à descoloração do mesmo. Este fenómeno pode ser influenciado por vários fatores

como o pH, temperatura, força iónica e reação de consumo de oxigénio. A formação de metamioglobina correlaciona-se positivamente com a oxidação lipídica (Chaijan *et al.*, 2007). Mioglobina e outros compostos heme, de elevada concentração em carnes vermelhas, funcionam como pró-oxidantes no tecido muscular. Tudo isto está de acordo com a diminuição da cor vermelha observada neste estudo. Tal como foi referido anteriormente, para os filetes de sardinha armazenados em gelo e em Algelo (100 e 500 mg de eq. ácido gálico/l), não existiram diferenças na diminuição da cor vermelha. No entanto, pode-se verificar que o valor de a^* para os filetes armazenados em Algelo é, tendencialmente superior até às 72h, o que pode indicar uma tendência para os filetes permanecerem mais avermelhados, facto que se relaciona bem com os resultados obtidos no índice de TBA às 48h. Tudo isto aponta para que a uma redução na taxa de degradação da hemoglobina e/ou da conversão de mioglobina, que se encontra retida no músculo intracelular, a metamioglobina, que se correlaciona positivamente com a oxidação lipídica (Chaijan, *et al.*, 2005). Esta não oxidação precoce da mioglobina, que funciona como pró-oxidante no tecido muscular, poderá dever-se à capacidade antioxidante que retarda a formação de metamioglobina que é um dos promotores da oxidação lipídica.

Em relação ao valor de L^* , verifica-se que às 24h e 48h os valores de L^* para filetes armazenados em gelo é superior, o que indica, tendo em conta que a escala do parâmetro L^* vai de 0 a 100 em que o zero é a cor preta e o 100 a cor branca, que a descoloração dos filetes é superior nestes filetes. Deste modo, parece existir uma melhor retenção de hemoglobina e mioglobina no músculo dos filetes de sardinha armazenados em Algelo.

Conclui-se que a alga *Fucus spiralis* tem uma elevada capacidade antioxidante. Quanto à produção de Algelo não existem perdas no processo de produção, facto que é muito relevante. No entanto o processo não é totalmente eficaz, pois o gelo não consegue manter incorporado o extrato de alga que possui polifenóis e outras moléculas com capacidade antioxidante, o que faz com que a partir das 24h o Algelo comece a perder capacidade antioxidante, que se reflete no facto de só observarmos diminuição do índice de TBA dos filetes de sardinha unicamente às 48h e só para a maior concentração de Algelo testada (500 mg de eq. de ácido gálico/ l).

Perspetivas futuras

6. Perspetivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que a alga *Fucus spiralis* tem uma elevada capacidade antioxidante. Quando incorporado o extrato desta alga no gelo, este não consegue reter as moléculas antioxidantes como os polifenóis, começando a descongelar ao fim de 24h, sendo estas moléculas lixíviadas. Futuramente, o processo de produção terá que sofrer alterações ou mesmo o modo como este extrato é aplicado ao pescado fresco. Em relação à extração escolhida, poderia ser a mesma podendo depois da extração liofilizar-se o extrato e posteriormente dissolver esse mesmo extrato em água, para produção de Algelo.

Em relação ao pescado utilizado, também se podia testar em outros peixes gordos como o salmão.

Para uma melhor avaliação da qualidade do pescado armazenado em Algelo poderão ser medidos mais parâmetros, inclusive a carga microbiológica ao longo do tempo, bem como a histamina, a gordura total, textura, entre outros.

Bibliografia

7. Bibliografia

- Alonso-Salces, Guyot, S., Herrero, C., Berrueta, L.A. Drilleau, J.-S., Gallo, B., Vicente, F. (2005) Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters. *Food Chemistry* 91, 91–98.
- Amsler, C. D., Fairhead, V.A. (2006) Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Advances in Botanical Research*. 43,1-91.
- Ashie, I.N., Smith, J.P., Simpson, B.K. (1996) Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.36, 87-121.
- Aubourg, S.P., Sotelo, C.G., Gallardo, J.M., (1997) Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*. 2, 295-304.
- Bandarra, N., Batista, I., Nunes, M., Empis, J. e Christie, W. (1997; a). Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*), *Journal of Food Science*. 62, 40-42.
- Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L. (2001) O Óleo de Sardinha e a Saúde. *IPIMAR-Divulgação*, n.º 18.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28, 25-30.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C.(2006). Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*. 99, 83–91.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C. (2005). Changes of pigments and colour in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*. 83, 607–617.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C. (2007) Characterisation of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle. *Food Chemistry* 100, 156–164.
- Chang-Bum, A., You-Jin, J., Dong-Soo, K., Tai-Sun, S., Bok-Mi, J. (2004) Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. *Food Research International*. 37, 253–258.
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., and Khoo, K.S. (2008) Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT – Food Science and Technology*. 41, 1067–1072.
- Chkhikvishvili, I.D., Ramazanov, Z. M. (1999) Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 36, 289-291.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15, 7313-7352.

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

Duan, X.-J., Zhang, W.-W., Li, X.-M. and Wang, B.-G. (2006) Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*. 95, 37–43.

Erickson, M.C. (2002) Chapter 12: Lipid Oxidation of Muscle Foods. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Akoh, C.C., Min, D.B. Second Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., pp.383-386.

Ferrari, C.K.B. (1998) Oxidation in food and biological systems: general mechanisms and nutritional and pathological implications. *Revista de Nutrição*. 11, 3-14.

Heo, S.-J., Park, E.-J., Lee, W.-K., Jeon, Y.-J. (2004) Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 96, 1613-1623.

Hull, M.A. (2011) Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 25, 547-554.

Huss, H. H. (1997) *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*. FAO Fisheries Technical Papers, 176p.

Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010): Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*. 28, 206-212.

Kang, K., Park, Y., Hwang, H.J., Kim, S.H., Lee, J.G., Shin, H.-C. (2003) Antioxidant properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive against vascular risk factors. *Archives of pharmacal research*. 6, 286-293.

Kilinc, B., Cakli, S. (2004) Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination. *Food Chemistry*. 88, 275–280.

Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., Soro, S. (2010) Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 3, 50 - 558.

Koivikko, R (2008) *Brown algal phlorotannins-Improving and applying chemical methods*. PhD dissertation, University of Turku, Turku, Finland.

- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T., Jormalainen, V. (2005) Contents of soluble, cell-wallbound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus Vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*. 3, 195-212.
- Louka, N., Juhel, F., Fazilleau, V., Loonis, P. (2004) A novel colorimetry analysis used to compare different drying fish processes. *Food Control*. 15, 327–334.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9, 29-35.
- Mayachiew, P., Devahastin, S. (2008) Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT- Food Science and Technology*. 41, 1153–1159.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., Nakamura, T. (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50, 889-893.
- NP 3356 (2009) Produtos da pesca e da aquicultura. Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (TBA). Método espectrofotométrico. Portugal
- NP 4424(2004) Produtos da pesca e da aquicultura. Preparação da amostra para análise físico-química. Portugal
- Osawa, C., Felício, P., Gonçalves, L. (2005) Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*. 28, 655-663.
- Pacheco-Aguilar, R.; Lugo-Sánchez, M.E., Robles-Burgueño, M.R. (2000) Postmortem Biochemical and Functional Characteristic of Monterey Sardine Muscle Stored at 0 °C. *Journal of Food Science*. 1, 40-47.
- Pereira, A.A.F.; Tenuta-Filho, A. (2005) avaliação de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25, 720-725.
- Pestana, C.M.P. (2007) Conservação de filetes de sardinha, *Sardina pilchardus*, sujeitos a estabilização com gás solúvel (SGS), embalados em ar, vácuo e atmosfera modificada. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia.
- Pinteus, S., Azevedo, S., Alves, C., Cruz, A., Afonso, C., Sampaio, M.M., Rodrigues, A.I., Pedrosa, P. (2009) High antioxidant potential of *Fucus spiralis* extracts collected from Peniche coast (Portugal). *New Biotechnology*. 25.
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, . (2008) In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*. 19, 31-39.

Pokorny, J.(2007) Chapter 11: Antioxidants in Food Preservation. In: Handbook of Food Preservation. Pokorny, M.S. Second Edition. Boca Raton: CRC Press, pp. 260-279.

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

Ramírez-Suárez, J.C., Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A. (2000) Washing Effects on Gelling Properties and Color of Monterey Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Minced Flesh. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2, 55-67.

Rodriguez-Casado, A., Carmona, P., Moreno, P., Sánchez-González, I., Macagnano, A., Di Natale, C. e Careche, M. (2007) Structural changes in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle during iced storage: Investigation by DRIFT spectroscopy. *Food Chemistry*. 103, 1024–1030.

Sadati, N., Khanavi, M., Mahrokh, A., Nabavi, S.M.B., Sohrabipour, J., Hadjiakhoondi, A. (2011) Comparison of antioxidant activity and Total Phenolic Contents of some Persian Gulf Marine algae. *Journal of Medicinal Plants*. 10, 73-79.

Salvador, N., Garreta, A.G., Lavelli, L. and Ribera, M. (2007) Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*. 71, 101-113.

Schoenwaelder, M.E.A., Wiencke, C. (2000) Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere fucoïds. *Plant Biology*. 2, 24-33.

Shahidi, F., Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Shahidi, F. Sixth Edition, Six Volume Set. Canadá: John Wiley & Sons, Inc., pp. 357-358.

Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G.S., Natarajaseebivasan, K. (2008) Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology*. 58, 535-541.

Simeonidou, S., Govaris, A., Vareltzis, K. (1998) Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Research International*. 7, 479-484.

Soares, S.E. (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 15, 71-8.
Swanson, A. K., Druehl, L., D. (2002) Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany*. 241-253.

Targett, N., Baier, R., Gerwick, W., Grimes, W., Pomponi, S. and Prince, R. (2002) Marine Biotechnology in the Twenty-first Century Problems, Promise, and Products. National Academy Press. Washington.

Vargas, P.N., Hoelzel, S.C., Rosa C.S. (2008) Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. *Alimentos e Nutrição*. 19, 11-15.

Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G. (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 116, 240-248.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. (2002) Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 1619-1624.

Yuan, Y.V., Walsh, N.A. (2006) Antioxidant and antiproliferativa activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*. 44, 1144-1150.

Zar, J.H. (2010) *Biostatistical Analysis*. 5th Edition. Pearson Prentice-Hall. Upper Saddle River.