



***Filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*): efeito da  
suplementação de antioxidantes naturais na  
estabilidade oxidativa.***

Ana Catarina Gravito Geada





***Filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*): efeito da  
suplementação de antioxidantes naturais na  
estabilidade oxidativa.***

Ana Catarina Gravito Geda

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

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Rui Ganhão e co-  
orientação do Doutor Rui Pedrosa

2012

Título: Filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*): efeito da suplementação de antioxidantes naturais na estabilidade oxidativa.

Copyright © Ana Catarina Gravito Geadá

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2012

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.

Dedico este trabalho a mim própria, pelo meu esforço e dedicação,  
à minha mãe pela possibilidade e apoio incondicional,  
ao meu companheiro pelo apoio, paciência e por esperar por mim,  
às minhas irmãs, sobrinho e amigos pela ajuda incansável,  
ao meu pai por me exigir que lute por uma vida melhor,  
a toda a minha família pelo apoio, carinho e compreensão  
e a todos os meus colegas, técnicos e professores  
que fizeram parte deste processo.



O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do vale Inovação “Produção de congelados de pescado suplementados com antioxidantes: viabilidade do projeto e transferência de conhecimento” (CENTRO-07-0401-FEDER-006391) financiado pelo QREN/MaisCentro/IAPMEI.





# Resumo

---

---



Embora haja um claro crescimento no sector das pescas, com maior número de espécies transacionadas em lota e em maior quantidade, o consumo do pescado não apresenta um aumento na mesma proporção. Durante alguns meses do ano, a sardinha existe em maior oferta do que procura por parte do consumidor. Como tal, o aproveitamento desta espécie, através de diversas tecnologias/processamentos proporciona diferentes benefícios. Ao aproveitar esta espécie, preparando-a, produzindo filetes e armazenando a baixas temperaturas, consegue-se disponibilizá-la durante todo o ano. Deste modo, é possível que não haja desperdícios e ainda aumentar o seu valor comercial (filetagem), visto ser um produto de baixo custo.

Neste trabalho efetuou-se a otimização do processo de adição de antioxidantes naturais aos filetes de sardinha congelados/refrigerados e avaliou-se o efeito da adição de dois antioxidantes naturais no processo de oxidação lipídica em filetes de sardinha, durante o seu armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}$ . Para a otimização do processo de adição de antioxidantes, avaliou-se a forma mais eficiente de adicionar os antioxidantes aos filetes de sardinha através de vários métodos e equipamentos, com o propósito de obter melhores resultados e economicamente, menos perdas. Para avaliar o efeito da adição dos antioxidantes nos filetes de sardinha, começou-se por conhecer a matriz do produto através da caracterização química dos filetes de sardinha e da análise ao perfil de ácidos gordos (apenas em filetes congelados). Depois, para avaliar o processo de oxidação lipídica efetuou-se análises aos produtos primários (índice de peróxidos – apenas em filetes congelados) e aos produtos secundários (TBARS), e ainda análise às alterações sensoriais (avaliação instrumental de cor). Por fim, realizou-se um teste hedónico de preferência para conhecer a opinião do consumidor sobre o produto com e sem antioxidante, aos filetes congelados.

Os antioxidantes naturais utilizados, tocoferóis (54 mg/0,10 ml/filete) e tocoferóis (15 mg/0,10 ml/filete) com extrato de rosmaninho (6,5 mg/ 0,10 ml/filete), demonstraram que exerceram atividade inibindo/retardando o processo oxidativo ao longo do tempo de armazenamento a baixas temperaturas. Em relação às amostras controlo, que apresentaram avançado processo de oxidação. Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os filetes tratados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de rosmaninho, pela observação tendencial dos resultados das análises e pelo teste hedónico de preferência dos consumidores verificou-se que os tocoferóis e extrato de rosmaninho promoveram um maior efeito sob a estabilidade oxidativa dos filetes.

O uso de antioxidantes naturais é uma solução pouco dispendiosa, que permite o aproveitamento total de produtos com menores desperdícios de produtos de pesca, com grande necessidade de escoamento. Em simultâneo, satisfaz as necessidades dos consumidores.

Palavras-chave: Sardinha, *Sardina pilchardus*, oxidação lipídica, análise sensorial.

# Abstract

---

---



Although there is a clear growth in the fisheries sector, with the largest number of species traded on auction and in greater quantity, fish consumption has not increased proportionately. During some months of the year there are sardines in larger supply than demand by consumers. As such, the use of this species by various technologies / processes provides different benefits. By taking advantage of this species, preparing it, producing fillets and storing at low temperatures, can it be available throughout the year. Thus, it is possible that is no waste and increases their commercial value (filleting), since it is a low cost product.

In this work we performed the optimization of the process of adding natural antioxidants for sardine fillets frozen / chilled and evaluated the effect of addition of two natural antioxidants in the process of lipid oxidation in fillets of sardines during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  /  $4^{\circ}\text{C}$ . For the optimization of the addition of antioxidants, we evaluated the most efficient way to add antioxidants to sardine fillets through various methods and equipment for the purpose of obtaining better results and cost less losses. To evaluate the effect of the addition of antioxidants in sardine fillets, it began to know the product matrix through chemical characterization of sardine fillets and analyzing the fatty acid profile (only in frozen fillets). Then, to follow the process of lipid oxidation was carried out analyzes of the primary products (peroxide value - only in frozen fillets) and secondary products (TBARS), and also analysis of the sensory changes (instrumental assessment of color). Finally, there was a test of hedonic preference to know the opinion of consumers about the product with and without antioxidant, the frozen fillets.

The natural antioxidants used, tocopherol (54 mg / 0.10 ml / fillet) and tocopherols (15 mg / 0.10 ml / fillet) with rosemary extract (6.5 mg / 0,10 ml / fillet) inhibited or retarded the oxidation over time of storage at low temperatures when compared with the control samples, that had advanced oxidation process. There was not statistically differences among the fillets treated with tocopherol in the presence and absence of rosemary extract. However, our laboratorial results shown slight tendency for the view that the antioxidant tocopherols and rosemary extract had a greater effect on the oxidative stability of fillets. This observation is in line with the hedonic test consumer preference.

The use of natural antioxidants is an inexpensive solution which allows the complete use of products with less waste of fish products and with a great need for disposal. At the same time meets the consumer's requirements.

Keywords: Sardine, *Sardina pilchardus*, lipid oxidation, sensory analysis.



# Índice





---

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>Resumo</b> .....   | <b>vii</b> |
| Abstract .....  | xi         |
| 1.1. Pesca e processamento dos produtos de pesca .....                  | 3          |
| 1.2. Sardinha ( <i>Sardina pilchardus</i> ) .....                       | 5          |
| 1.2.1. Caracterização físico-química e nutricional .....                | 5          |
| 1.2.2. Consumo de sardinha em Portugal .....                            | 7          |
| 1.2.3. Alterações qualitativas da sardinha .....                        | 8          |
| 1.3. Oxidação lipídica .....  | 9          |
| 1.3.1. Mecanismos e fatores .....                                       | 9          |
| 1.3.2. Métodos de avaliação do processo de oxidação .....               | 11         |
| 1.3.3. Efeitos de oxidação lipídica nos produtos de pesca .....         | 14         |
| 1.4. Processos de conservação por refrigeração e congelação .....       | 15         |
| 1.5. Antioxidantes .....  | 17         |
| 1.5.1. Mecanismos e fatores .....                                       | 17         |
| 1.5.2. Antioxidantes Sintéticos .....                                   | 18         |
| 1.5.3. Antioxidantes naturais .....                                     | 19         |
| II. Enquadramento, Objetivos, Desenho Experimental .....                | 21         |
| III. Materiais & Métodos .....  | 25         |
| 3.1. Materiais .....  | 27         |
| 3.1.1. Sardinhas .....  | 27         |
| 3.1.2. Reagentes .....  | 27         |
| 3.1.3. Equipamentos .....   | 27         |
| 3.1.4. Antioxidantes .....  | 28         |
| 3.2. Métodos .....  | 28         |
| 3.2.1. Receção da sardinha e Preparação do filete .....                 | 28         |
| 3.2.2. Otimização do processo de adição de antioxidantes naturais ..... | 30         |
| 3.2.3. Preparação da amostra .....                                      | 30         |
| 3.2.4. Caracterização do Filete de Sardinha .....                       | 32         |

---

---

|  |    |
|--|----|
| 3.2.5. Estabilidade oxidativa .....  | 35 |
| 3.2.6. Análise Sensorial .....   | 37 |
| 3.2.7. Análise estatística .....   | 38 |
| IV. Resultados .....   | 39 |
| 4.1. Otimização do processo de adição dos antioxidantes .....  | 41 |
| 4.2. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em refrigeração ..... | 43 |
| 4.2.1. Caracterização dos filetes de Sardinha .....  | 43 |
| 4.2.2. Estabilidade oxidativa .....  | 44 |
| 4.3. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em congelação .....   | 48 |
| 4.3.1. Caracterização dos filetes de Sardinha .....  | 48 |
| 4.3.2. Estabilidade oxidativa .....  | 50 |
| 4.3.3. Análise Sensorial Hedónica .....  | 57 |
| V. Discussão .....   | 61 |
| 5.1. Otimização do processo de adição dos antioxidantes .....  | 63 |
| 5.2. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em refrigeração ..... | 64 |
| 5.2.1. Caracterização dos filetes de Sardinha .....  | 64 |
| 5.2.2. Estabilidade oxidativa .....  | 65 |
| 5.3. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em congelação .....      | 69 |
| 5.3.1. Caracterização dos filetes de Sardinha .....  | 69 |
| 5.3.2. Estabilidade oxidativa .....  | 71 |
| 5.3.3. Análise Sensorial Hedónica .....  | 77 |
| VI. Conclusão, Perspetivas Futuras .....   | 79 |
| VII. Bibliografia .....  | 85 |

# I. Introdução

---

---



### 1.1. Pesca e processamento dos produtos de pesca

O ato de pescar surgiu quando o Homem procurava alimento para se alimentar, começando com a captura manual de moluscos bivalves. Esta atividade contribuiu para a sedentarização junto dos cursos de água, o que possibilitou a evolução de técnicas de captura através de instrumentos como o anzol. Com o avançar dos tempos, a atividade da pesca tornou-se um modo de vida, que moldou culturas e deu origem a várias tradições. Em Portugal, a pesca tornou-se de grande importância económica, pois devido aos seus vastos quilómetros de costa marítima abundante em peixe, possibilitou e potenciou o comércio e as artes relacionadas (Nunes, *et al.* 2008).

No final do século XIX, o setor das pescas sofreu algumas alterações com o desenvolvimento tecnológico nas embarcações e com a introdução do frio como técnica de conservação nas indústrias alimentares, o que por consequência causou preocupações no que respeita à gestão de recursos pesqueiros. Mais tarde, com a globalização dos mercados e com o desenvolvimento de novos produtos e tecnologias, os padrões de consumo alteraram-se e a procura de novos produtos aumentou. Em Portugal, os produtos de pesca mais procurados foram evoluindo em função dos hábitos alimentares, acessos às zonas pesqueiras, abundância de recursos e métodos de conservação. Tem-se como exemplo, a população litoral que tinha acesso ao peixe fresco capturado na zona, mas no interior do país o peixe só se consumia salgado ou salgado seco. As principais alterações no consumo surgiram em 1960, quando o número de espécies disponíveis aumentou e se começou a consumir peixe congelado (Nunes, *et al.* 2008; Monteiro, E. 2009).

Os portugueses com a longa tradição de apreciadores de pescado têm um consumo *per capita* aproximado de 57 kg/ano/habitante, representando cerca de 25% da dieta alimentar. São os maiores consumidores da Europa, o que leva ao aumento da procura por informação sobre os benefícios do consumo dos produtos da pesca para a saúde e bem-estar. As espécies transacionadas em lota em maior número são a sardinha, a cavala, o carapau e o peixe-espada preto, como se pode observar na tabela 1 (Gomes, A. 2012; FAO, 2004-2012; INE, 2012).

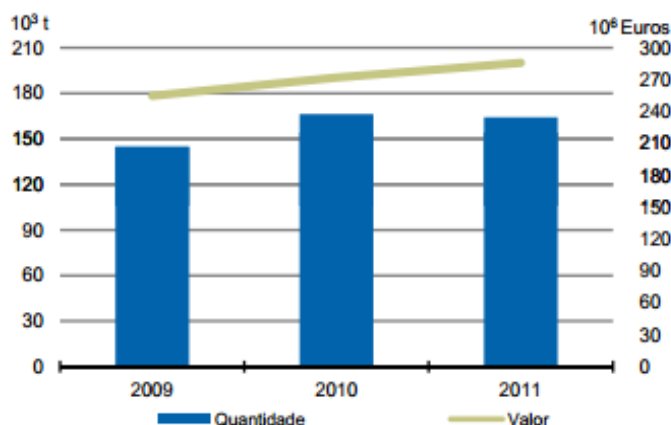
**Tabela 1** – Quantidade das espécies mais transacionadas em lota, descarregadas em Portugal e, em específico, no porto de Peniche, em 2011 (INE, 2012).

| <b>Espécies</b>           | Toneladas descarregadas em | Toneladas descarregadas no |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                           | Portugal                   | Porto de Peniche           |
| <b>Peixes Marinhos</b>    | 147 971                    | 14 927                     |
| <b>Sardinha</b>           | 55 222                     | 4 454                      |
| <b>Cavala</b>             | 31 089                     | 3 198                      |
| <b>Atum</b>               | 13 877                     | 778                        |
| <b>Carapau</b>            | 10 024                     | 1 359                      |
| <b>Peixe-espada preto</b> | 5 556                      | 5                          |

Os avanços científicos e tecnológicos que ocorreram nos últimos anos propiciaram o surgimento de novos produtos, produtos retransformados e também produtos funcionais, destinados a um público consumidor cada vez mais esclarecido e interessado em alimentos saudáveis, procurando que o seu consumo seja benéfico para a saúde e para o bom funcionamento do organismo. Esta procura de alimentos mais saudáveis está relacionada ao facto da atual geração estar mais atenta a questões como alimentação vs saúde e bem-estar, estar tecnologicamente favorecida e com mais confiança na qualidade e segurança dos produtos. Aliado a estes fatores, por outro lado está a falta de tempo e uma vida muito agitada, que leva à necessidade de compra de produtos pré-cozinhados (Passador, *et al.* 2006).

Embora haja um claro crescimento no sector das pescas, com maior número de espécies transacionadas em lota e em maior quantidade (figura 1), o consumo do pescado não apresenta um aumento na mesma proporção (INE, 2012). Como tal, é importante estabelecer estratégias que consigam o aproveitamento dos produtos de pesca, com o mínimo de percas possível, a nível económico e de desperdícios, e ainda acrescentar valor aos produtos melhorando a rentabilidade das empresas. Em simultâneo, completar as necessidades do consumidor, como anteriormente referido, em produtos previamente preparados. Para tal, deve-se dar ênfase nos métodos de processamento de produtos de pesca, como produtos preparados/eviscerados, filetados, defumados, salgados, enlatados, embutidos e reestruturados. E ainda fazer um correto aproveitamento dos resíduos gerados para a produção de farinhas e óleos de peixe (Bombardelli, R., Syperreck, M. e Sanches, E., 2005). Atualmente, já se utiliza peixes inteiros para o desenvolvimento de produtos de pescado transformados e reestruturados e não apenas o uso de matéria-prima subvalorizada. Este facto está relacionado com a situação do mercado de peixe inteiro de várias espécies se

encontrar um pouco saturado (Cardoso, *et al.* 2010). Para contrariar esta tendência, desenvolveram-se novos produtos que satisfaçam o consumidor em termos de qualidade, conveniência, preço e atributos nutricionais e benéficos para a saúde. Este tipo de produtos permite reformular, eliminar constituintes e adicionar outros compostos que aumentem a qualidade do produto (Borderías, *et al.* 2005).



**Figura 1** - Capturas nominais de pescado fresco ou refrigerado, em portos nacionais (2009-2011). Do total capturado, 164 236 toneladas corresponderam a pescado fresco ou refrigerado, transacionado em lota, no valor de 285 880 mil euros o que representa um decréscimo de 1,2% em volume e um aumento de 5,1% em valor, relativamente ao ano 2010 (INE, 2012).

## 1.2. Sardinha (*Sardina pilchardus*)

### 1.2.1. Caracterização físico-química e nutricional

A composição bioquímica dos peixes é constituída por 50 a 85% de água, 12 a 24% proteínas, 0,1 a 22% de lípidos e 2% de sais minerais, vitaminas e hidratos de carbono. De acordo com o teor de gordura, os peixes são qualificados em magros, semi-gordos e gordos, como é o caso da sardinha. Os lípidos têm como função biológica servirem como reserva energética, formação de membranas celulares e sua manutenção, sinalizadores intra e intercelulares e de isoladores térmicos (Nunes, *et al.* 2008; Ogawa, M. e Maia, E. 1999).

O peixe é um alimento de fácil digestão e rico nutricionalmente. O consumo de pescado devido a sua composição rica em ácidos gordos insaturados, como os ácidos gordos da família do ómega 3, tem sido associado à redução do risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Dias, D. 2012; Torpy, J. 2006).

A sardinha é um peixe pelágico abundante em zonas de afloramento, suportando importantes pescarias costeiras. Em águas portuguesas, a sardinha sobrevive durante 8 anos, conseguindo ao fim de um ano atingir 15-16 cm de comprimento e reproduzir pela primeira vez. A sardinha, capturada em Portugal, tem uma variação anual no teor de gordura de aproximadamente 16%, evidenciando-se os meses de Fevereiro e Março com um teor de gordura próximo dos 2% e os meses de Agosto, Setembro e Outubro com teores próximos de 18%. Esta variação dá-se devido à influência de fatores bióticos como a disponibilidade de alimentos, grau de maturação sexual, idade e sexo, e fatores abióticos como a zona geográfica, época do ano e a salinidade da água (Bandarra, *et al.* 1997; Nunes, *et al.* 2008).

Os ácidos gordos são compostos orgânicos simples e são classificados por saturados quando não possuem ligações duplas e por insaturados quando possuem uma ou mais ligações duplas (monoinsaturados ou polinsaturados (PUFA), respetivamente). A quantidade e o perfil de ácidos gordos variam de espécie para espécie. Nos peixes, os ácidos gordos saturados mais comuns são o ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0) e o esteárico (18:0), e os ácidos gordos insaturados mais comuns são o ácido oleico (18:1  $\omega$ 9) e as famílias do ómega 6 (ex: ácido linoleico) e ómega 3 (ex: ácido linolénico). Na família do ómega 3 os mais abundantes são o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5  $\omega$ 3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ 3). Na família do ómega 6, é abundante o ácido linoleico (LA, 18:2  $\omega$ 6) e o araquidónico (ARA, 20:4  $\omega$ 6) (Nunes, *et al.* 2008; Ogawa, M. e Maia, E. 1999; Ordóñez, *et al.* 2005, a e b).

É pela composição de ácidos gordos insaturados, principalmente PUFA da família ómega 3, que a carne de peixe se distingue da carne dos animais terrestres, sendo considerado um alimento mais saudável do ponto de vista nutritivo, por isso o seu consumo tem vindo a aumentar (Ogawa, M. e Maia, E. 1999).

Os ácidos gordos da família do ómega 6 são muito importantes no desempenho do desenvolvimento cerebral, na estrutura e tempo de vida das células e também na proteção da pele. No entanto, quando consumidos em excesso podem causar envelhecimento celular precoce, alterações na estrutura das membranas celulares, anomalias na multiplicação celular e indução do aparecimento de carcinomas e formação abundante de compostos que podem causar o entupimento dos vasos sanguíneos (Candeias, *et al.* 2005). Os ácidos gordos da família do ómega 3 estão associados ao melhor funcionamento e proteção do sistema cardiovascular, ao desenvolvimento do córtex cerebral e das capacidades cognitivas das crianças. Por

outro lado, alimentações pobres em ácidos gordos da família do ómega 3 aumentam o risco da ocorrência de trombozes, aterosclerose, doenças cardíacas, alterações neurológicas, dificuldades de aprendizagem e dificuldades na visão. No entanto, o excesso de consumo destes ácidos gordos pode causar dificuldades de resposta à infeção e alterações da coagulação sanguínea com tendência para a hemorragia (Candeias, *et al.* 2005). Segundo Shahidi (2000), os ácidos gordos da família do ómega 3 têm capacidade para reduzir os níveis de colesterol e de triglicéridos no sangue. A família do ómega 3 e do ómega 6 competem pelas mesmas enzimas, que quando degradadas formam eicosanóides. Os eicosanóides provenientes da família do ómega 3 têm uma atividade vasodilatadora, causam menor agregação de plaquetas e menores respostas inflamatórias, quando comparados com os ácidos gordos provenientes da família do ómega 6 (Jauy, R e Valenzuela, A. 2000). Atuando estes, também na expressão genética e na comunicação intercelular. É necessário considerar as quantidades recomendadas de consumo diário dos mesmos, consumido em equilíbrio para que haja o desenvolvimento normal do organismo (Simopoulos, A. 2000). Como tal, alguns autores e órgãos de saúde, em diferentes países, estabeleceram recomendações sobre o consumo da razão entre ómega 6 e ómega 3, tabela 2 (Martin, *et al.* 2006).

**Tabela 2** - Valores recomendados para a razão entre os ácidos gordos ómega 6 e ómega 3 na dieta. Fonte: Martin, *et al.* 2006.

| País ou instituição | $\omega 6/ \omega 3$ | Referências                    |
|---------------------|----------------------|--------------------------------|
| Canadá              | 4:1 – 10:1           | Scientific Review Committee;   |
| EUA                 | 2:1 – 4:1            | Simopoulos; Schaefer           |
| França              | 5:1                  | Chardigny <i>et al.</i>        |
| Japão               | 2:1 – 4:1            | Kris-Etherton <i>et al.</i>    |
| Suécia              | 5:1                  | Nordic Council<br>of Ministers |
| WHO/FAO             | 5:1 – 10:1           | World Health Organization      |

### 1.2.2. Consumo de sardinha em Portugal

Em Portugal, a sardinha é um dos recursos pesqueiros mais importantes, pois é a principal espécie capturada, representando cerca de 40% das capturas totais do ano. Como tal, devido à importância socio-económica e da necessidade de apoiar a administração na gestão do recurso, a investigação científica sobre as sardinhas tem aumentado (Stratoudakis, Y. e Silva, A. 2001).

A sardinha é uma espécie muito abundante na nossa zona pesqueira, principalmente durante alguns meses do ano e é nesses precisos meses que nem toda a sardinha capturada pode ser aproveitada, devido ao excesso do produto no mercado que posteriormente, não consegue ser totalmente escoado. Para resolver esta questão, o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, garante que existem apoios à retirada de sardinha do mercado com objetivo de posterior transformação em novos produtos para venda, com uma garantia de preço na ordem dos 50% do preço médio de venda em lota. O que promove a elaboração de produtos reestruturados ou filetados, que são tão procurados pelo consumidor (Bexiga, 2005).

### *1.2.3. Alterações qualitativas da sardinha*

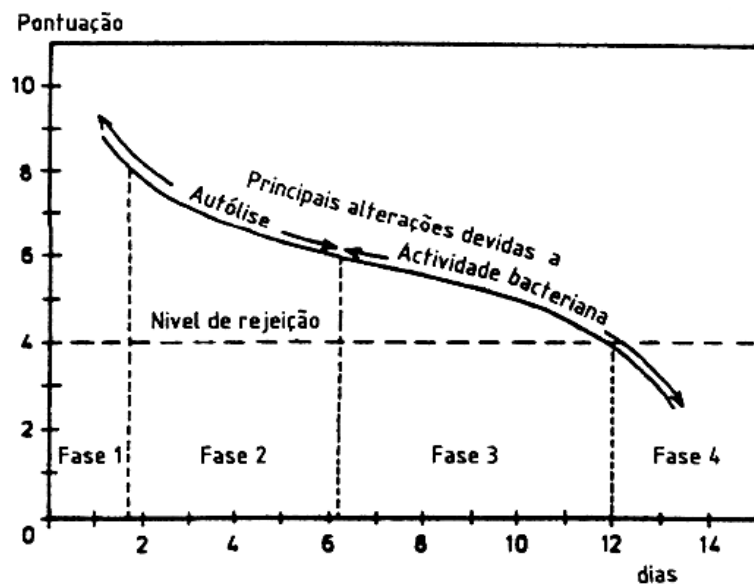
A sardinha sendo um peixe gordo com elevado teor lipídico, composto principalmente por ácidos gordos insaturados, e com um elevado teor em proteínas, faz com que seja um produto de pesca muito suscetível à deterioração. O estado de deterioração é evidente em produtos de pesca através de deteção de cheiros e sabores desagradáveis, formação de muco, produção de gás, coloração anormal e alterações na textura. Estas alterações que ocorrem nos produtos de pesca resultam de um conjunto de reações microbiológicas, químicas e autolíticas, e são detetadas através de uma avaliação sensorial da frescura do peixe, uma propriedade difícil de definir e como tal, percebida pelos sentidos de quem avalia (Huss, H.H. 1997).

Os peixes contêm uma flora muito diversa, onde as bactérias Gram negativas psicotróficas sejam frequentemente, dominantes. Mas durante a armazenagem, desenvolve flora característica que contribui para a deterioração através da formação de metabolitos (como trimetilamina e sulfureto de hidrogénio) que desenvolvem cheiros e sabores desagradáveis (Huss, H.H. 1997).

É na fração lipídica do peixe que ocorrem as principais alterações químicas, como os processos de oxidação. Este processo como consequência da formação de compostos primários de oxidação, não causa sabores desagradáveis no peixe mas faz com que surjam colorações castanhas ou amareladas no tecido de peixe. Mas na formação de compostos secundários, confere ao peixe um sabor forte a ranço (Huss, H.H. 1997).

Os processos autolíticos são responsáveis pela perda de qualidade inicial do peixe fresco, contribuindo em parte para a deterioração do peixe (figura 2). Quando o peixe se encontra congelado, enzimas autolíticas convertem óxido de trimetilamina em dimetilamína e em formaldeído. O formaldeído formado provoca um aumento na

desnaturação do músculo do peixe, conseguindo assim, alterar a textura do peixe e diminuir a sua capacidade de retenção de água (Huss, H.H. 1997).



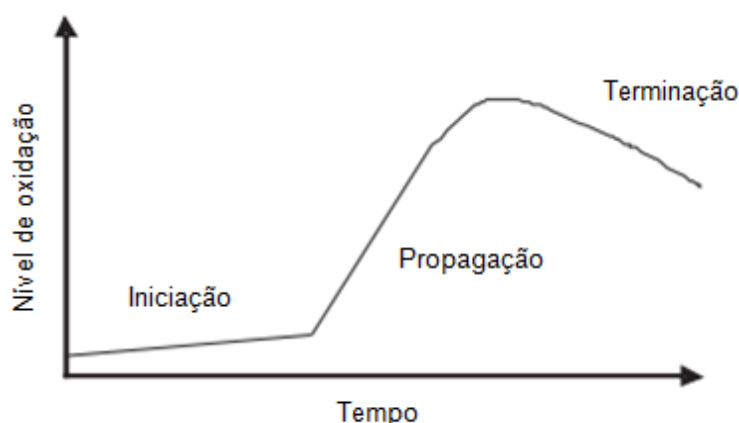
**Figura 2** - Alterações na qualidade sensorial do bacalhau conservado em gelo (0°C).  
 Fonte: Huss, H.H. (1997).

### 1.3. Oxidação lipídica

#### 1.3.1. Mecanismos e fatores

A sardinha sendo um peixe com elevado teor lipídico, composto por muitos ácidos gordos insaturados, quando exposta a fatores favoráveis, torna-se muito suscetível e perecível aos processos de oxidação. Nesta espécie, os lípidos da epiderme são mais oxidáveis do que os lípidos presentes no músculo. Os fatores impulsionadores do processo de oxidação lipídica são a presença de luz UV, o aumento da temperatura, catalisadores metálicos (ferro e cobre), catalisadores orgânicos férricos (hemoglobina) e enzimas lipolíticas (Huss, H.H., 1997; Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002).

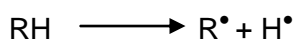
O processo de oxidação nos lípidos resulta de várias reações em cadeia de radicais livres, nos alimentos, designado por auto-oxidação que, quando iniciadas, a sua velocidade está em constante incremento. Estas reações dividem-se por três fases, a iniciação, a propagação e a terminação (figura 3) (Hamilton, *et al.* 1997).



**Figura 3** – Nível de oxidação lipídica consoante a fase do processo, iniciação, propagação e terminação. Fonte: Koleva, I. (2007).

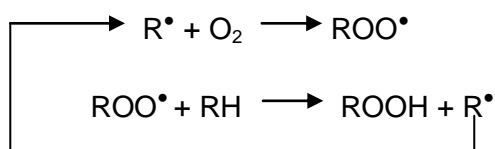
A fase da iniciação ocorre quando, na presença de agentes iniciadores (IN), como luz, calor ou iões metálicos, os ácidos gordos insaturados (RH) perdem um átomo de hidrogénio instável, formando radicais livres ( $R^\cdot$ ) (equação 1).

*Equação 1.*



Na fase de propagação, os radicais livres provenientes das reações da fase de iniciação, quando sujeitos à presença de oxigénio, são convertidos em outros radicais instáveis, os radicais peróxidos ( $ROO^\cdot$ ). Estes logo interagem com um átomo de hidrogénio de outro ácido gordo insaturado, dando origem aos produtos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) ( $ROOH$ ) e outros radicais livres (equação 2). Estes produtos primários não alteram o sabor do produto, mas possibilitam o surgimento de pigmentações castanhas ou amareladas no tecido do peixe (Hamilton, *et al.* 1997; Koleva, I. 2007; Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002).

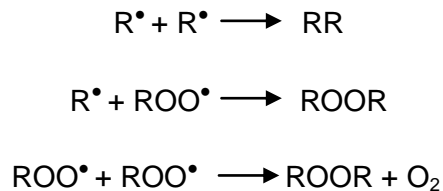
*Equação 2.*



Durante a última fase, a terminação, ocorre compatibilidade entre radicais, formando assim, compostos estáveis, os produtos secundários da oxidação (compostos voláteis e não voláteis) (equação 3). São estes produtos secundários, os

responsáveis por causar odores e *off-flavors* (sabores desagradáveis) nos produtos, designado por ranço, e por vezes pigmentações de cor amarela (Hamilton, *et al.* 1997; Koleva, I. 2007; Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002).

*Equação 3.*



### 1.3.2. Métodos de avaliação do processo de oxidação

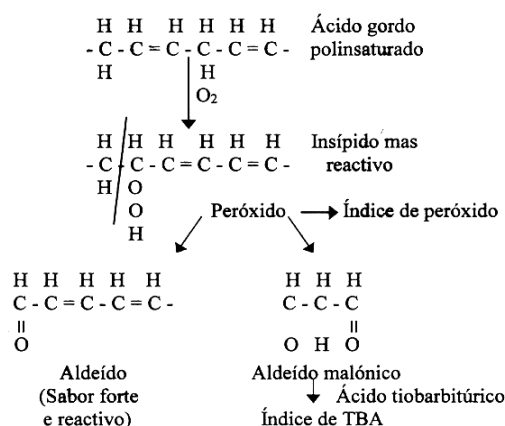
#### *Índice de peróxidos*

Os hidroperóxidos e os peróxidos são os produtos primários resultantes do processo de oxidação mais importantes, mas a sua quantificação é limitada pela sua natureza instável. Durante a fase de indução, a taxa inicial de formação de hidroperóxidos é transcendida pela sua taxa de decomposição, o que se inverte nas fases posteriores, quando ocorre reação com outros componentes alimentares ou o desenvolvimento em produtos secundários de oxidação. Quando a decomposição de hidroperóxidos é igual ou superior à sua formação, estes não são bons indicadores do processo de oxidação (Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002). Como tal, quando existe uma quantificação baixa de peróxidos pode representar uma avaliação precoce de estado de oxidação avançado. Por esta razão, quando se compila esta análise com a quantificação de produtos secundários de oxidação, como TBARS, alguns resultados podem ser contraditórios. Mas como não existe nenhum método químico único para analisar a correlação entre o processo de oxidação e as alterações nas propriedades sensoriais dos lípidos oxidados, é fundamental recorrer a métodos que quantifiquem e analisem os produtos primários e secundários, resultantes do processo de oxidação, ao longo do tempo. A quantificação de peróxidos em peixes implica uma extração de lípidos com solventes antes de efetuar a análise. Esta deve ser feita de forma a evitar maior decomposição de peróxidos ou perda dos mesmos durante a evaporação do solvente. Foram executados e aperfeiçoados vários procedimentos e combinações de solventes para extrair os lípidos. Frequentemente, a extração é executada com uma mistura de solventes polares e não polares, como descrito, por exemplo, por Bligh & Dyer (1959), que recorrem ao uso de uma mistura de clorofórmio com metanol numa proporção de 1:2 (v/v). Existem vários procedimentos e equipamentos para a

quantificação de peróxidos, designado por índice de Peróxidos (IP): o método iodométrico que se baseia numa titulação de iodo libertado do iodeto de potássio por peróxidos; o método de oxidação ferrosa com indicador laranja de xilenol – FOX – é baseado na capacidade dos peróxidos em oxidar os iões ferrosos a iões férricos, a pH baixo, e é um método analisado por espectrofotometria; o equipamento de cromatografia gasosa – espectrofotometria de massa (GC-MS); o equipamento de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) acoplado de um detetor de fluorescência (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2008; 2010; Huss, H.H., 1997; Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002).

*Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico*

A análise e quantificação de produtos secundários resultantes do processo de oxidação é mais apropriada que a quantificação de produtos primários, pois são compostos estáveis e de odor ativo. Estes compostos estáveis são os aldeídos, cetonas, alcanos, hidrocarboxilos e álcoois, estes são mais facilmente detetáveis e quantificáveis, para além de refletirem melhor o estado de deterioração do produto (figura 4).



**Figura 4** - Processos básicos envolvidos na oxidação dos ácidos gordos polinsaturados que se encontram no tecido do peixe. Fonte: Huss, H.H., (1997).

O 1,3-propanedial (MDA) é um dialdeído de três carbonos com grupos carbonilo nas posições C-1 e C-3. O MDA é um produto secundário, muito reativo que permanece ligado a outros ingredientes alimentares, que se liberta num tratamento com ácido e calor. A análise ao índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) é um método espectrofotométrico, no qual se mede a absorvância de um complexo rosa fúscia formado entre o TBA e MDA. O MDA é a substância mais reativa detetada na análise de TBA, mas não é única, são também outros produtos fruto da oxidação como os  $\alpha,\beta$ -

aldeídos insaturados e compostos não voláteis. Como tal, atualmente esta análise é designada por TBARS – análise ao Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002). A reação ocorre quando a forma malónica de MDA reage com os grupos ativos de metileno do TBA, levando à formação de um complexo rosa fúscia e quanto mais intensa for a cor, maior é a concentração de MDA. Este complexo formado é detetável por espectrofotometria através do visível a 530nm. A ocorrência de formação adicional de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, durante a análise devido ao aquecimento e acidificação, pode levar a um número sobrestimado de TBARS (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2008). Nomeadamente, o aquecimento que ocorre durante método de destilação que proporciona um aumento da degradação dos peróxidos que ainda existem na solução, levando à possibilidade de formação de produtos secundários de oxidação, acrescentando assim a quantificação de TBARS, mesmo na presença de agentes quelantes e antioxidantes fenólicos. É uma análise relativamente contestada porque para além de outros produtos secundários de oxidação lipídica, existem outras substâncias como açúcares e aminoácidos que interferem com o complexo colorido formado, o que se torna problemático em substâncias com elevadas quantidades destes agentes interferentes quando submetidas a altas temperaturas. Para tentar reduzir este erro são testados diferenciais de temperatura e tempo, diferentes métodos de incubação do TBA-MDA (extração vs destilação) (Ganhão, *et al.* 2011) e recorre-se, também, a utilização de técnicas executadas em GC e HPLC (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2008; Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010; Huss, H.H., 1997; Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002).

#### *Avaliação instrumental da cor*

Para que ocorra a medição de cor é necessário que haja interação entre três fatores. O sistema de cor CIE transforma o espectro de reflexão ou transmissão da amostra num espaço de cor tridimensional usando a distribuição espectral de potência do iluminante e a correspondência às cores dos padrões observados. O sistema CIE  $L^*a^*b^*$ , também conhecido por CIELAB, atualmente é o mais usado na indústria alimentar. As coordenadas  $L^*a^*b^*$  auxiliam a definir a localização de qualquer cor num espaço de cor uniforme. A avaliação feita da cor pode ser dividida em termos subjetivos e objetivos. Como termos subjetivos, isto é, psicossensoriais, temos o brilho, luminosidade, tonalidade, saturação, croma e colorido. Colorido é a sensação visual de acordo com maior ou menor cor cromática de uma amostra. A tonalidade é o atributo descrito por nomes de cores tais como vermelho, verde e púrpura. A

saturação representa o colorido em proporção ao seu brilho, enquanto croma é o colorido em relação ao brilho do meio envolvente. A luminosidade é parâmetro que se relaciona ao brilho (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2008; Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010). Este parâmetro não é afetado pelo nível de iluminação, porque representa a proporção da luz refletida. Já o brilho aumenta com um aumento do nível de iluminação. Os termos objetivos, isto é, psicofísicos, estão relacionados ao estímulo e avaliados a partir de distribuição de energia espectral, a refletância ou transmitância da amostra e a resposta do observador. O sistema CIELAB expressa as coordenadas através da diferença de cor total ou por correlação dos parâmetros, luminosidade, croma e tonalidade. A cor é a percepção que o cérebro tem, resultante da detecção de luz após a sua interação com um objeto. Como consumidores, somos sensíveis à cor dos alimentos, acabando por estimular o nosso apetite. É muito comum, a percepção do consumidor através de outros sentidos ficar comprometida pela percepção que retira da avaliação da aparência (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2008; Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2010). Nos produtos de pesca, as alterações de coloração ocorrem depois da morte do peixe, devido à perda de células pigmentadas e por ocorrer processos de oxidação nos pigmentos, causando aparecimentos de manchas negras em algumas espécies. Posteriormente, a cor das guelras altera-se por atividade bacteriana e por desidratação, e em simultâneo, no decorrer do processo de oxidação de lípidos, pode ocorrer o aparecimento de coloração amarelada na pele (Medeiros, S. 2012). Para além disso, apresenta descolorações vermelhas próximas da espinha (Ordóñez, *et al.* 2005, b). Como por exemplo, o consumidor avalia essencialmente os produtos cárneos através da sua aparência. O que se torna prejudicial à venda destes produtos, visto que a cor deste tipo de alimentos não é estável, na medida em que se altera consoante o grau de frescura. Como um peixe acabado de desembarcar, em que a sua aparência é bastante atrativa, em que os seus tons subtis transmitem cores agradáveis aos olhos, tornando-se num produto apetecível ao consumidor. Mas este mesmo peixe, após algumas horas perde o seu brilho e as suas cores tornam-se mais neutras, tornando-se um produto banal e menos procurado (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel 2008; 2010; Ganhão, *et al.* 2010, a).

### 1.3.3. Efeitos de oxidação lipídica nos produtos de pesca

O processo de oxidação lipídica causa nas matrizes alimentares alterações na sua textura e desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo. Para além disso, causa degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos gordos essenciais (polinsaturados), que por consequência,

diminui a qualidade nutricional do produto. Por outro lado, podem ser resultantes do processo de oxidação, compostos potencialmente tóxicos, comprometendo a integridade e segurança do produto (Ramalho, V. e Jorge, N., 2006). Todos estes fatores diminuem a aceitabilidade do produto, por parte do consumidor (figura 5).



**Figura 5** – Sardinhas num estado avançado de deterioração. Fonte própria.

#### **1.4. Processos de conservação por refrigeração e congelação**

A utilização do frio como método de conservação de alimentos é um dos métodos mais antigos, já o homem primitivo guardava a sua caça no meio do gelo proveniente da natureza, para poder alimentar-se da sua caça mais tarde (Nunes, *et al.* 2008).

A utilização de baixas temperaturas na indústria permitiu o armazenamento e o transporte de produtos perecíveis. Quando se desenvolveram, aproximadamente em 1830, equipamentos frigoríficos, possibilitou-se a importação de produtos perecíveis como carne, vinda da Argentina ou Austrália para a Europa em boas condições, como também permitiu que os consumidores finais tivessem produtos refrigerados e congelados de melhor qualidade (Ordóñez, *et al.* 2005, a).

O pescado quando é sujeito a um processamento de conservação sofre alterações na composição química, de uma forma mais ou menos intensa consoante a tecnologia utilizada. O uso de baixas temperaturas permite a conservação dos produtos porque inibe parcialmente os fatores responsáveis pela alteração/deterioração dos alimentos,

como a atividade microbiana, a atividade metabólica dos tecidos, enzimas e reações químicas. No entanto, pode ocorrer perda de aroma, dessecação das camadas externas do peixe, rancificação de lípidos e quando cozida, a carne de peixe, tem uma textura mais dura (Ordóñez, *et al.* 2005, b).

A conservação por frio é uma técnica que permite uma disponibilidade de utilização de matéria-prima, tanto no tempo como na distância geográfica. Embora a refrigeração e a congelação se baseiem no mesmo princípio de utilização de baixas temperaturas, as repercussões são diferentes. A congelação é dos processos mais importantes para manter o produto com qualidade, prolongando o tempo de vida útil dos produtos alimentares sejam estes frescos ou processados, com repercussões mínimas nas suas características nutritivas e sensoriais. Quando a água presente no peixe congela, a mudança do estado líquido para o físico ocasiona um aumento de volume, mas como a congelação forma-se primeiro na superfície do peixe, a expansão do volume é prejudicada formando pressão interna o que pode provocar deformação. Durante o processo de congelação, as alterações verificadas no peixe, são reduzidas, no entanto verifica-se desidratação e alterações nas proteínas e nos lípidos, o que por consequência resulta numa alteração nas características organolépticas. Como tal, devido à perda de água no estado líquido, ocorre uma maior concentração dos outros nutrientes (Ordóñez, *et al.* 2005, a). A congelação impõe uma redução maior de temperatura, abaixo do ponto de congelação, aproximado dos  $-18^{\circ}\text{C}$ . Neste caso, a mudança não ocorre apenas no calor interno, ocorre também uma mudança na água da matriz que passa ao estado sólido, gelo. Deste modo, inibe-se a atividade microbiana e reduz-se a atividade enzimática e as reações químicas, permitindo tempos de vida útil bastante longos (Ogawa, M. e Maia, E. 1999; Ordóñez, *et al.* 2005, a). A ultracongelação é um processo de congelação de produtos muito rápido até  $-18^{\circ}\text{C}$ . O facto de ser um processo muito rápido, congelando a água interna e externa das células em simultâneo, permite que haja menos degradação das células da matriz alimentar, permitindo manter melhor a qualidade do produto. Após esta rápida diminuição de temperaturas, os produtos de pesca, recomenda-se que sejam armazenados a temperaturas  $-30^{\circ}\text{C}$ , embora a ultracongelação possa atingir temperaturas inferiores a  $-100^{\circ}\text{C}$  (FAO, 2001).

A refrigeração consiste na redução e manutenção da temperatura dos alimentos acima do ponto de congelação, 8 e  $-1^{\circ}\text{C}$ , isto é, apenas implica mudanças na temperatura interna do produto. Apesar de reduzir a atividade enzimática e microbiana e inibir reações químicas, estes fenómenos não são evitados completamente, fazendo

com que a refrigeração prolongue a vida útil do produto durante um período limitado. Nos peixes, especialmente de águas frias, a refrigeração é menos eficaz, porque o seu metabolismo já se encontra adaptado a essas temperaturas e porque tem um teor elevado de ácidos gordos insaturados que possibilita um maior número de reações químicas (Ogawa, M. e Maia, E. 1999; Ordóñez, *et al.* 2005, a).

## **1.5. Antioxidantes**

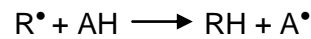
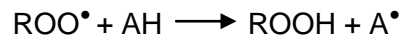
### *1.5.1. Mecanismos e fatores*

Quando os peixes se encontram no estado *post-mortem* e são sujeitos a processamento e armazenamento por um longo período de tempo, os seus antioxidantes endógenos são consumidos sequencialmente e como tal os lípidos são eventualmente oxidados, sendo necessária a adição de antioxidantes exógenos para retardar o início da oxidação lipídica e prolongar a vida útil destes produtos (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010).

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, conseguem retardar ou impedir, significativamente, a oxidação a esse mesmo substrato. Os antioxidantes fornecidos pelos alimentos, especialmente de origem vegetal, são essenciais para contrabalançar o stress oxidativo. Nas matrizes alimentares, os antioxidantes são moléculas que protegem macromoléculas, neutralizando o processo de oxidação, e conseguem fazê-lo de diferentes maneiras tais como, protegendo os lípidos do contacto com os precursores do processo oxidativo e agindo como agentes que previnem a oxidação lipídica, paralisando a fase de propagação (Lidon, F. e Silvestre, M., 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados por primários, sinergistas, supressores de oxigénio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes (AH) primários são os compostos fenólicos que ajudam na remoção ou inativação dos radicais livres provenientes do decorrer das fases de iniciação e propagação do processo de oxidação, através da cedência de átomos de hidrogénio, interrompendo o processo de oxidação (equação 4) e formando radicais inertes (A<sup>•</sup>). Os átomos de hidrogénio provenientes do antioxidante são sequestrados mais facilmente por radicais livres que os átomos de hidrogénio provenientes de lípidos insaturados (Ramalho, V. e Jorge, N. 2006; Koleva, I. 2007).

*Equação 4.*



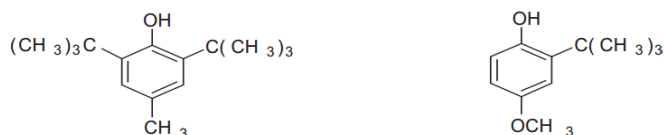
Os antioxidantes primários mais comuns são os sintéticos butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e propil galato (PG) e os de origem natural, tocoferóis e polifenóis provenientes de frutos, especiarias e ervas aromáticas.

Os antioxidantes sinergistas são compostos usados para aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando combinados adequadamente. Os supressores de oxigênio, tal como o nome indica, são compostos que sequestram o oxigênio presente no meio, tornando estes indisponíveis para o processo de auto-oxidação. Os antioxidantes biológicos são enzimas como a glutatona peróxidase e catalases, que neste caso específico conseguem remover peróxido de hidrogênio. Existem outras defesas antioxidantes enzimáticas que têm capacidade de remover compostos altamente reativos da matriz do alimento. Os agentes quelantes complexam íons metálicos, como cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica (exemplo, ácido etileno diamino tetra acético (EDTA)). Por fim, os antioxidantes mistos incluem compostos derivados de plantas e animais, como ácido cafeico e flavonoides (Ramalho, V. e Jorge, N. 2006).

#### *1.5.2. Antioxidantes Sintéticos*

Os antioxidantes sintéticos são muito utilizados como aditivos alimentares, como o caso do butil-hidroxianisolo (BHA) e do butil-hidroxitolueno (BHT) (figura 6). Estes podem ser adicionados isoladamente ou misturados com galatos, atuam na prevenção da oxidação de gorduras e de óleos e são utilizados na produção ou preparação de géneros alimentícios submetidos a processamento térmico (Lidon, F. e Silvestre, M., 2007). No entanto o uso destes antioxidantes têm sido muito criticado porque existem estudos que indicam que BHT e BHA têm propriedades cancerígenas, que aumentam a síntese de enzimas digestivas no fígado (pode provocar aumento da taxa catabólica das vitaminas A e D), risco de alergias (manifestadas por erupções cutâneas, urticária ou eczema), aumento dos níveis de colesterol e lípidos no sangue, acumulação de tecidos adiposos e hipercinesia. De tal modo que não são permitidos em produtos

específicos para o consumo de crianças e bebés (Lidon, F. e Silvestre, M., 2007). Devido aos indícios de que estes antioxidantes podem provocar problemas de saúde, tem sido feita investigação no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, com objetivo de estes substituírem ou serem combinados com os sintéticos (Ramalho, V. e Jorge, N. 2006).



**Figura 6** – BHT e BHA, respetivamente. Fonte: Koleva, I. (2007).

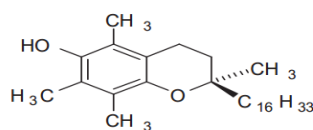
### 1.5.3. Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais são isolados a partir de frutos, plantas aromáticas, chá, sementes, etc. Recentemente, os antioxidantes naturais, adquiriram interesse como substitutos dos antioxidantes sintéticos, visto que estes são, atualmente, considerados como potencialmente tóxicos. Os antioxidantes naturais são facilmente aceites pelos consumidores, porque são considerados seguros, tanto que nem foi considerada a necessidade de executar testes de toxicidade visto que fazem parte da composição dos alimentos e estes já são consumidos desde um tempo muito longínquo. Mas como qualquer outro produto, tem alguns aspetos menos favoráveis: são mais caros em relação aos sintéticos; precisam de ser purificados, porque caso contrário não são muito eficientes e podem ter propriedades diferentes se a preparação variar; e podem conferir aroma, sabor ou cor desfavorável ao produto (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010; Lidon, F. e Silvestre, M., 2007). No entanto uma grande variedade de frutos e extratos fenólicos tem sido relacionados com o aumento da estabilidade oxidativa em alimentos de origem animal, com particular destaque para os frutos silvestres como melhor fonte de compostos fenólicos (Heinonen, H. 2007; Estévez, *et al.* 2007; Ganhão, *et al.* 2010, b). O mercado dos produtos da pesca já recorreu ao uso destes antioxidantes naturais, adicionou-os a óleos de peixe e a peixes, com o objetivo de retardar o processo oxidativo. Existem vários casos descritos: os orégãos secos são eficazes na prevenção do processo oxidativo no óleo de cavala; os compostos fenólicos com extratos de rosmaninho são muito eficazes quando utilizados em sardinha, óleo de fígado de bacalhau, carapau, emulsões de óleo em água e outros óleos de peixe; os polifenóis do chá verde protegem a carpa prateada e óleos de peixes; extratos fenólicos de uva foram aplicados com sucesso nos compostos

lipídicos presentes nos músculos de peixes; os polifenóis extraídos de azeite extra virgem retardam a oxidação do óleo presente nas conservas de atum, do carapau e em óleos de peixe (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010; Lidon, F. e Silvestre, M., 2007). Há polifenóis em particular, que estando isolados ou misturados com outros antioxidantes, são mais eficazes do que antioxidantes sintéticos na prevenção de oxidação em óleos marinhos ou em peixes congelados (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010). Os antioxidantes retardam o processo oxidativo mas não o impedem totalmente. Após algum tempo a ação dos antioxidantes pode ficar saturada, como tal, a utilização de vários antioxidantes em simultâneo pode ser muito importante, de forma a exercerem uma ação sinérgica na sua função (Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel, 2010; Lidon, F. e Silvestre, M., 2007).

O antioxidante natural mais usado é o tocoferol. Este é utilizado na prevenção do processo oxidativo em alimentos com elevado conteúdo lipídico. Os tocoferóis podem ser divididos em alfa, beta, gama e delta tocoferol, sendo este último mais eficaz como antioxidante (Ramalho, V. e Jorge, N. 2006).

O alfa tocoferol (figura 7), também designado como vitamina E é um antioxidante natural, muito eficaz e solúvel em lípidos. Este antioxidante tem como função eliminar radicais peróxido para terminar reações em cadeia do processo oxidativo. O  $\alpha$ -tocoferol tem sido considerado em diversos estudos como um antioxidante altamente eficiente, uma vez que reage com os radicais livres resultantes da fase inicial do processo oxidativo, de uma forma muito rápida impedindo que estes estejam envolvidos em quaisquer outras reações. E assim, este acaba transformado num radical razoavelmente estável (Lidon, F. e Silvestre, M., 2007).



**Figura 7** –  $\alpha$ -tocoferol. Fonte: Koleva, I. (2007).

II. Enquadramento,  
Objetivos,  
Desenho Experimental



### **Enquadramento**

Durante alguns meses do ano, a sardinha existe em maior oferta do que procura por parte do consumidor. Como tal, o aproveitamento desta espécie, em particular, através de diversas tecnologias/processamentos proporciona diferentes benefícios tanto para o comerciante como para o consumidor. Ao aproveitar esta espécie, preparando-a, produzindo filetes e armazenando a baixas temperaturas, consegue-se disponibiliza-la durante todo o ano. Deste modo, é possível que não haja desperdícios nem perdas de financeiras e ainda, se possível, aumentar o seu valor comercial (filetagem), visto ser um produto de baixo custo.

### **Objetivos**

O objetivo geral deste trabalho foi efetuar a otimização do processo de adição de antioxidantes naturais aos filetes de sardinha congelados/refrigerados e avaliar o efeito da adição de dois antioxidantes naturais no processo de oxidação lipídica em filetes de sardinha, durante o seu armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  ao longo de seis meses e a  $4^{\circ}\text{C}$  durante vinte e quatro horas.

Para alcançar este objetivo, seguiu-se os seguintes objetivos específicos:

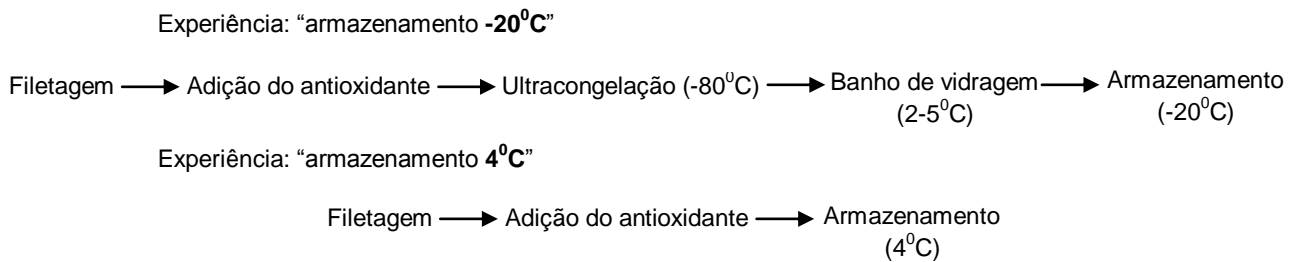
- Avaliar a forma mais eficiente de adicionar os antioxidantes aos filetes de sardinha através de vários métodos e equipamentos, com o fim de obter melhores resultados e economicamente, menos perdas.
- Caracterizar o filete de sardinha quanto à sua composição em água, proteína, lípidos e compostos minerais.
- Avaliar o efeito dos antioxidantes no processo oxidativo através da análise de produtos primários e secundários resultantes do processo oxidativo e da análise às alterações sensoriais.
- Qualificar a opinião do consumidor através de uma análise sensorial de carácter visual sobre o produto com e sem antioxidante, com um período de armazenamento de 2, 4 e 6 meses.

## Desenho experimental

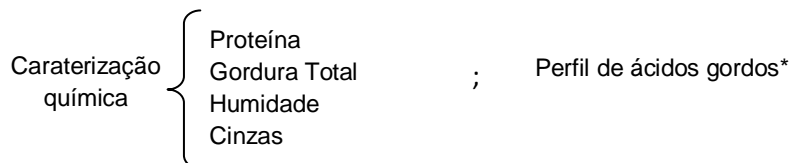
### 1ª Fase – Decisão sobre a forma de adição dos antioxidantes



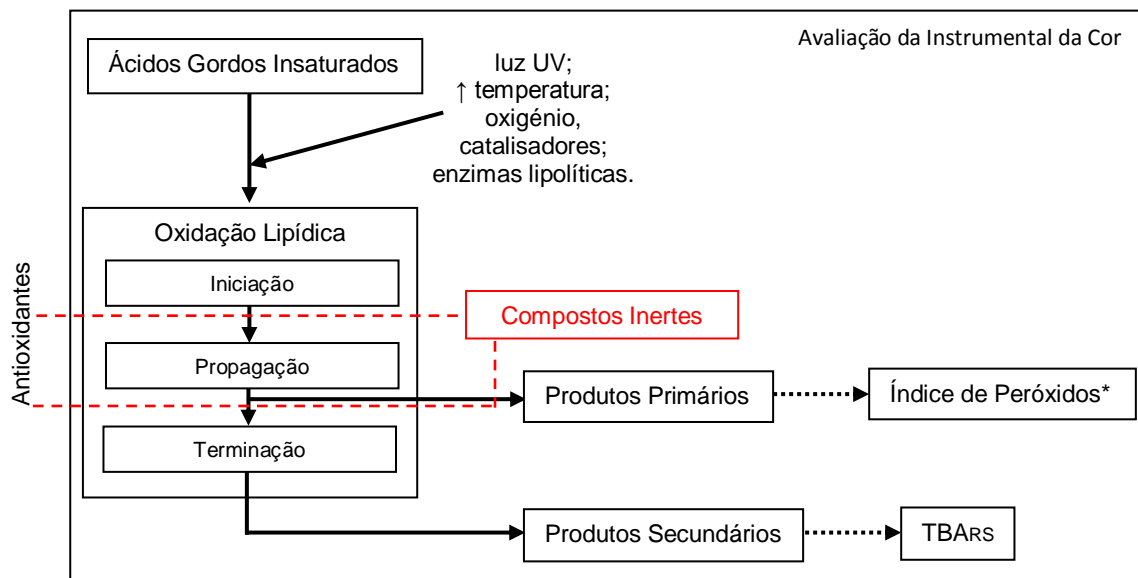
### 3ª Fase – Preparação dos filetes de Sardinha



### 4ª Fase – Caracterização do filete de Sardinha



### 5ª Fase – Avaliação da estabilidade oxidativa ao longo do tempo de armazenamento.



### 6ª Fase – Avaliação da Apreciação visual por parte dos consumidores\*

\* - Análises que não foram realizadas na experiência de "armazenamento 4°C".

# III. Materiais & Métodos

---

---



### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Sardinhas

As sardinhas (*Sardina pilchardus*) frescas foram capturadas na costa de Peniche, Portugal, em Junho de 2011 e 2012. 200 sardinhas frescas fizeram o lote utilizado para a experiência com armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e outro lote com 100 sardinhas frescas foram utilizadas na experiência com armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados para as análises de laboratório, realizadas neste estudo, tinham grau de pureza p.a. e foram obtidos de diversas fontes. Ácido bórico (Pronalab, Portugal); ácido clorídrico (Panreac, Espanha); ácido sulfúrico concentrado (Panreac, Espanha); ácido tiobarbitúrico (Merck, Alemanha); ácido tricloroacético (Scharlau, Espanha); água de HPLC (Fisher Scientific, United Kingdom); água pura (Fisher Scientific, United Kingdom); cloreto de acetilo (Merck, Alemanha); cloreto de bário (Panreac, Espanha); cloreto de ferro (Scharlau, Espanha); clorofórmio (Analak Normapur, França); ácido etilenodiamino tetra-acético (Panreac, Espanha); etanol (Panreac, Espanha); galato de propilo (Merck, Alemanha); hidróxido de sódio (EKA Chemicals, Portugal); metanol (Scharlau, Espanha); n-heptano (Carlo Erba, Itália); sulfato de ferro (Analar Normapur); verde bromocresol (Panreac, Espanha); vermelho de metilo (Scharlau, Espanha); xilenol (Prolabo, Bélgica); 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (Aldrich Chemistry, China).

#### 3.1.3. Equipamentos

Neste estudo foram utilizados os seguintes equipamentos:

- agitador – vortex (Zx3, Velp Scientifica);
- arca frigorífica (Beka);
- balança analítica (*Explorer Pro – EP213*, OHAUS (incerteza - 0.001 g));
- banho (vidragem);
- banho-maria (*GD 120*, Grant Instruments);
- centrifugadora (*Centrifuge 5804R*, Eppendorf);
- colorímetro (*Chroma Meter CR-400*, Konica Minolta);
- coluna cromatográfica Trace TR-FAME (Thermo Electron Corporation);

- congelador (*Ufaan 400 NF INDESIT* (-20°C));
- cromatógrafo gasoso (Finnigan Trace GC Ultra com Autosampler AS 3000, Thermo Electron Corporation);
- destilador (Foss Kjeltex 2100, based on Tecator™ Technology);
- destilador de água (*Crysta, Aurora*);
- digestor (Digester 2006 Foss, based on Tecator™ Technology);
- espectrofotómetro (*Helios α*, Thermo Electron Corporation);
- estufa (Binder);
- homogeneizador (*Pikatti 1705 FL, Flama*);
- micro-insert (Thermo Unicam)
- mufla (Nabertherm More Than Heat 30-3000°C);
- pulverizador (pistola - Pistolas HVLP, *U-pol*; bomba de pressão - *Einhell*);
- rotavapor (*LABOROTA 4000 – Efficient*, Heidolph);
- ultracongelador (*Forma -86C Ult Freezer*, Thermo Electron Corporation).

#### 3.1.4. Antioxidantes

Os antioxidantes utilizados neste estudo foram o Antioxidante Mix de Tocoferóis (FT), designado por *Vitapherole T-50*, com uma mistura de tocoferóis de 516 g/kg de solução, disponibilizado por *VitaeCaps, S.A.* O *Vitapherole T-50* encontra-se no estado líquido misturado numa solução de óleo de girassol. E o Antioxidante Mix de Tocoferóis com extrato de rosmaninho (FTR), designado por *Ronoxan Map R1*, com uma mistura de tocoferóis de 150 g/kg de produto, disponibilizado por *Disproquímica*. Este antioxidante encontra-se no estado sólido, liofilizado, como tal foi dissolvido em óleo de girassol. O óleo de girassol utilizado é um óleo comercial. Este óleo de girassol também é utilizado como controlo positivo (C2).

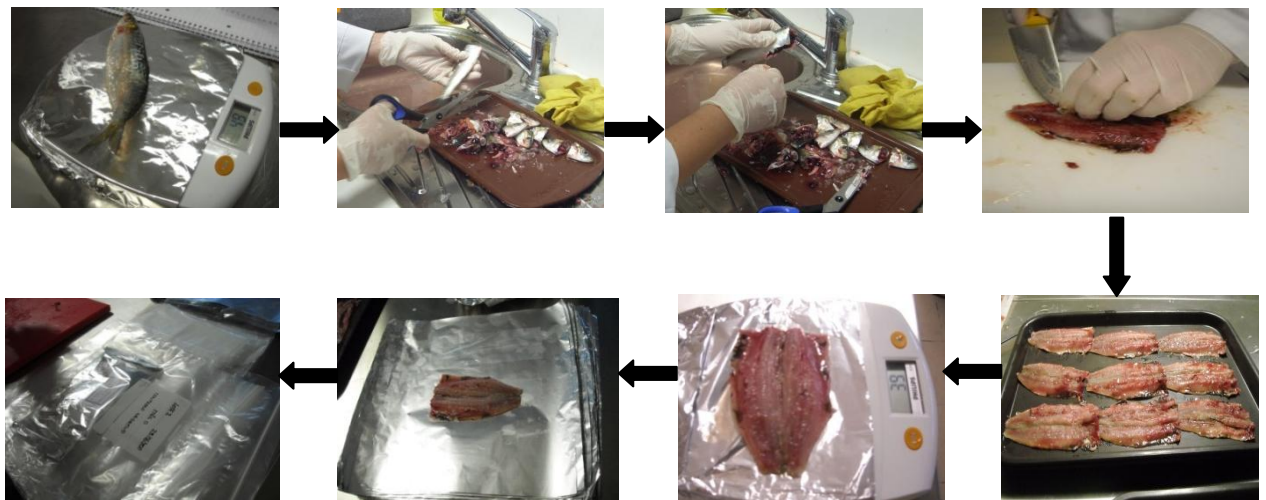
### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Receção da sardinha e Preparação do filete

##### 3.2.1.1. Receção da sardinha e Preparação do filete - armazenamento a -20°C

O lote de sardinhas, composto por 200 sardinhas frescas, com um peso médio de  $63,80 \pm 8,21$  g, foi colocado em gelo dentro de um recipiente de poliestireno, quando comprado, e transportado até ao laboratório, em cerca de 10 minutos. No laboratório,

iniciou-se a preparação dos filetes: a cada sardinha, com o auxílio de uma tesoura de preparação de peixe, retirou-se a cabeça, barbatana caudal e as vísceras e lavou-se em água corrente para retirar o excesso de sangue; posteriormente, com a ajuda de uma faca, retirou-se a espinha dorsal separando, com a ponta da faca rente à espinha, o músculo da espinha, fez-se o filete e lavou-se os filetes em água corrente para retirar novamente o excesso de sangue. Todas as sardinhas foram pesadas quando inteiras e quando filetadas. Após este processo de filetagem, de cada sardinha resultou um filete ( $38,12 \pm 5,05$  g) que foi devidamente embalado e codificado (figura 8).



**Figura 8** – Fluxograma ilustrativo do processo de preparação e filetagem da sardinha fresca (Pesagem da sardinha; remoção da cabeça, barbatana caudal e vísceras; extração da espinha dorsal; preparação do filete de sardinha; pesagem do filete; embalamento e codificação do filete).

### 3.2.1.2. Receção da sardinha e preparação do filete - armazenamento a 4°C

O lote de sardinhas, composto por 100 sardinhas frescas, com um peso médio de  $94,64 \pm 4,90$  g, foi colocado em gelo dentro de um recipiente de poliestireno, quando comprado, e transportado até ao laboratório, em cerca de 10 minutos. No laboratório, iniciou-se a preparação dos filetes: a cada sardinha, com o auxílio de uma tesoura de peixe, retirou-se a cabeça, barbatana caudal e as vísceras e lavou-se em água corrente para retirar o excesso de sangue; posteriormente, com a ajuda de uma faca, retirou-se a espinha dorsal separando, com a ponta da faca rente à espinha, o músculo da espinha, fez-se o filete e lavou-se os filetes em água corrente para retirar novamente o excesso de sangue. Todas as sardinhas foram pesadas quando inteiras e quando filetadas. Após este processo de filetagem, de cada sardinha resultou um filete ( $50,08 \pm 4,15$  g).

### 3.2.2. Otimização do processo de adição de antioxidantes naturais

Durante o ensaio do processo de adição de antioxidantes naturais – mix de tocoferóis sem e com extrato de rosmaninho – ponderou-se várias circunstâncias, perante as características dos antioxidantes: i) de que modo se adicionaria (imersão ou aspersão), ii) em que condições se adicionaria (tempo, pressão e quantidade) e iii) em que fase se adicionaria o antioxidante (antes da vidragem ou durante a vidragem).

O processo de imersão testado executou-se segundo o método descrito por Ozogul, *et al.* (2010). Resumidamente colocou-se numa tina com 1L de óleo de girassol misturado com 10g de antioxidante com extrato de rosmaninho, em que através de uma rede, se coloca 3 filetes de sardinha de cada vez (30 filetes de sardinha por litro) e se imerge durante 2 minutos. Depois retira-se os filetes da imersão e deixa-se escorrer durante 1 minuto, O método de aspersão consistiu na utilização de um equipamento com capacidade para aspergir as soluções densas e gordurosas com antioxidantes, aspergir sob a superfície dos filetes de sardinha, durante um determinado tempo, a quantidade e pressão, foram também testadas. Todo este processo teve de ser experimentado passo a passo, por não haver nenhuma fonte sobre um método igual ou similar descrito.

Para se findar condições de trabalho, experimentou-se várias pressões (entre 20 e 50 psi), experimentou-se vários tempos de aspersão (5,10 e 15 segundos) e consoante o tempo de aspersão, experimentou-se qual a quantidade ideal a ser aspergida, através da observação da interação/absorção do antioxidante na superfície do filete de sardinha.

Perante estes dados também se avaliou que fase seria a ideal para adicionar o antioxidante, se antes da vidragem no caso de aspersão ou imersão ou se durante o processo de vidragem, se o antioxidante fosse adicionado por imersão. Neste segundo caso, colocar-se-ia o antioxidante no banho de vidragem.

### 3.2.3. Preparação da amostra

#### 3.2.3.1. Preparação da amostra – armazenamento a $-20^{\circ}\text{C}$

O lote foi dividido em 4 grupos (48 filetes de sardinha por grupo): i) controlo negativo (C1) – filete sem adição de óleo ou antioxidante, ii) controlo positivo (C2) – filete com adição de óleo girassol, iii) antioxidante mix (FT) – filete com adição de antioxidante mix de tocoferóis e iv) antioxidante rosmaninho (FTR) – filete com adição de antioxidante mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho.

O óleo de girassol e os antioxidantes foram adicionados, manualmente, aos filetes por aspersão (30psi) durante 10 segundos por cada filete de sardinha, através de uma

pistola e bomba de pressão, segundo o protocolo otimizado neste estudo (figura 9). O antioxidante mix de tocoferóis foi adicionado numa concentração de 54 mg/filete e o antioxidante mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho numa concentração de 15 mg/filete. Posteriormente, os filetes foram envolvidos por uma película plástica (para que a folha de alumínio não adira à superfície do filete) e depois por folha de alumínio (para evitar que o produto seja exposto à luz), em seguida foram distribuídos por sacos selados (para evitar a exposição ao oxigénio) e submetidos a ultracongelação ( $-80^{\circ}\text{C}/6\text{h}$ ). Os filetes congelados foram sujeitos a um processo de vidragem, com a água entre 2 a  $5^{\circ}\text{C}$ , durante 1 minuto cada. De seguida, os filetes foram armazenados num congelador, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 6 meses.

Após a preparação dos filetes tratados, retirou-se amostras para serem analisadas e caracterizadas (mês 0) e a cada 60 dias de armazenamento foram retiradas outras amostras para serem analisadas de forma a permitir avaliar a evolução do processo oxidativo ao longo do tempo, durante 6 meses.



Figura 9 – Adição do óleo de girassol (C2) e dos antioxidantes sem e com extrato de rosmaninho (FT e FTR), por aspersão.

### 3.2.3.2. *Preparação da amostra – armazenamento a $4^{\circ}\text{C}$*

O lote foi dividido em 4 grupos (24 filetes de sardinha por grupo): i) controlo negativo (C1r) – filete sem adição de óleo ou antioxidante, ii) controlo positivo (C2r) – filete com adição de óleo girassol, iii) antioxidante mix (FTr) – filete com adição de antioxidante mix de tocoferóis e iv) antioxidante rosmaninho (FTRr) – filete com adição de antioxidante mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho.

O óleo de girassol e os antioxidantes foram adicionados, manualmente, aos filetes por aspersão (30psi) durante 10 segundos por cada filete de sardinha, através de uma pistola e bomba de pressão, segundo o protocolo otimizado neste estudo. O antioxidante

mix de tocoferóis foi adicionado numa concentração de 54 mg/filete e o antioxidante mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho numa concentração de 15 mg/filete. Posteriormente, os filetes foram distribuídos por tabuleiros e colocados em refrigeração (4°C).

Após a preparação dos filetes tratados, retirou-se amostras para serem analisadas e caracterizadas (0h) e depois às 6, 12 e 24 horas de armazenamento foram retiradas outras amostras para serem analisadas de forma a permitir avaliar a evolução do processo oxidativo ao longo do tempo.

#### *3.2.4. Caracterização do Filete de Sardinha*

##### *3.2.4.1. Caracterização química*

A caracterização química do lote foi determinada pela análise a 4 parâmetros: humidade, proteína bruta, gordura total e cinzas. Foram retirados 6 filetes de sardinha do lote sem qualquer tipo de aditivo. Estes foram picados em separado e subdivididos por análises. As análises efetuaram-se em duplicado.

##### *3.2.4.1.1. Humidade*

A humidade foi determinada segundo o método descrito em AOAC, 2000. Isto é, em cada cadinho foi colocado 15g areia do mar e 5g de amostra e para facilitar a formação de uma mistura homogénea, adicionou-se a cada cadinho 10ml de etanol. Este preparado é colocado em estufa durante 6 horas a 103°C. De seguida retiram-se os cadinhos colocam-se no exsiccador e mede-se a massa. O teor de humidade é então calculado pela diferença entre a massa inicial do cadinho com a areia e amostra (P1) e a massa final do cadinho com a areia e amostra após 6 horas de estufa (P2), a dividir pela massa da amostra (M):

$$\% \text{ humidade} = \frac{(P1 - P2)}{M} \times 100$$

##### *3.2.4.1.2. Proteína*

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de *Kjeldahl* (NP 4488, 2009) e é resultado do produto do teor em azoto mineral com um coeficiente de 6,25, que

representa a riqueza das proteínas animais. Este método começa por efetuar uma digestão às amostras (0,5g), com ácido sulfúrico concentrado, a quente, na presença de catalisadores, com o objetivo de converter o azoto orgânico em azoto mineral (ião amónia). Posteriormente, o azoto mineral sofre uma destilação por arrastamento de vapor para a libertação do amoníaco, com hidróxido de sódio a 40%, para uma solução de ácido bórico a 4% com indicador (verde bromocresol e vermelho de metilo). Esta solução será então titulada com ácido clorídrico (HCl) a 0,1M, numa titulação ácido-base por retorno, determinado o ponto de equivalência consegue-se quantificar o teor de proteína bruta:

$$\text{Teor de azoto total} - N_T \left( \frac{g}{100g} \right) = \left[ \frac{14 \times (V_a - V_b) \times N}{m} \right] \times 100$$

$V_a$  - volume (ml) de sol. HCl gasto na titulação da amostra;  $V_b$  - volume (ml) de HCl gasto na titulação do branco;  $N$  - concentração de HCl;  $m$  - massa (g) da toma para análise.

$$\text{Proteína Bruta} - P_B \left( \frac{g}{100g} \right) = N_T \times 6,25$$

#### 3.2.4.1.3. Gordura

A gordura total foi extraída pelo método de *Bligh & Dyer* (1959) com algumas modificações. Resumidamente, o método consiste em colocar em tubos *falcon* 5g de amostra e adicionar 20 ml de metanol e 10 ml de clorofórmio, agita-se durante 2 minutos. Adiciona-se mais 10 ml de clorofórmio e agita-se novamente durante 2 minutos. De seguida acrescenta-se 10ml de água pura, agita-se mais 2 minutos e centrifuga-se a solução por 10 minutos a 2000 rpm. Terminada a centrifugação retira-se o *pellet* com a ajuda de uma pipeta *pasteur* para outro tubo *falcon* e adiciona-se 20ml de 10% (v/v) metanol em clorofórmio, para uma segunda extração, e agita-se mais 2 minutos. Em balões periformes, coloca-se a solução a evaporar pelo rotavapor, a 40°C. Para garantir a secagem completa do resíduo, coloca-se o balão durante 1 hora a 104°C numa estufa. O teor de gordura é então calculado pela diferença entre a massa do balão periforme ( $M_i$ ) e a massa do balão periforme com o resíduo de gordura ( $M_f$ ), a dividir pela massa da amostra ( $P_a$ ):

$$\text{Teor de Gordura (\%)} = \frac{M_f - M_i}{P_a} \times 100$$

#### 3.2.4.1.4. Cinzas

As cinzas foram determinadas segundo o método descrito na Norma Portuguesa 2032 (2009). Este procedimento consiste em colocar 5g de amostra num cadinho, este vai durante 3 horas a uma estufa, a 100°C, para secagem, depois é carbonizada em placa de aquecimento, até cessar libertação de fumos. E por fim, transfere-se os cadinhos para a mufla, onde se completa a incineração a 500°C em ciclos de 4 horas até peso constante. O teor de cinza presente na amostra é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Teor de cinza (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

$m_1$  – massa (g) do cadinho;  $m_2$  – massa (g) do cadinho com a toma;  $m_3$  – massa (g) do cadinho com a cinza.

#### 3.2.4.2. Perfil de ácidos gordos

O perfil dos ácidos gordos na sardinha foi determinado pelo método descrito por Lepage & Roy (1986). Este método consiste em colocar cerca de 300mg de gordura num tubo de vidro roscado e a adicionar 5ml da mistura de cloreto de acetilo (1:19). Esta mistura é homogeneizada num agitador durante 30 segundos e colocada em banho-maria a 80°C durante 1 hora. De seguida, os tubos são mantidos à temperatura ambiente, para arrefecerem, e é-lhes adicionado 1mL de água de HPLC e 2mL de n-heptano. Esta solução foi agitada por um agitador durante 1 minuto e, de seguida, centrifugada a 1500rpm durante 5 minutos. Por fim, a fase orgânica foi recolhida para frascos com *micro-insert*. Caso a fase orgânica seja muito concentrada pode-se diluir a solução com n-heptano. Por fim, a fase orgânica resultante, isto é, o conteúdo lipídico resultante das amostras, é analisada por um cromatógrafo gasoso. A coluna cromatográfica Trace TR-FAME usada na análise possui 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura. Da leitura feita pelo equipamento, obtém-se cromatogramas, que pela área dos seus picos, relacionados com tempos de retenção comparados com os padrões internos, consegue-se calcular as percentagens de cada

composto presente na amostra. Os resultados são expressos em percentagem (n=3). As condições de operação estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3** - Condições operacionais utilizadas para executar análise ao perfil de ácidos gordos por GC.

|                         |  |
|-------------------------|--|
|                         | Temp <sup>a</sup> . Inicial = 60°C, 1 min.   |
| <b>Forno</b>            | 1 <sup>a</sup> Rampa: aumentar 15°C/min até 150°C e manter por 1 min.<br>2 <sup>a</sup> Rampa: aumentar 5°C/min até 220°C e manter por 10 min. |
| <b>Injetor</b>          | Temperatura = 250°C<br>Modo: splitless.  |
| <b>Amostra</b>          | Volume injetado = 1µl<br>Gás de arraste: hélio com um caudal de 1,5ml/min.   |
| <b>Detetor</b>          | FID<br>Temperatura = 260°C.<br>Caudal de ar: 350ml/min.<br>Caudal de hidrogénio: 355ml/min.  |
| <b>Tempo de análise</b> | 35 min.  |

### 3.2.5. Estabilidade oxidativa

#### 3.2.5.1. Índice de peróxidos (IP)

O índice de peróxidos foi determinado de acordo com o método FOX, descrito por Hermes-Lima *et al.* (1995), que consiste na quantificação da oxidação de ferro. É um método baseado na capacidade dos peróxidos lipídicos em oxidar os iões ferrosos a pH ácido. A oxidação resultante é quantificada através da reação de um indicador com os complexos férricos, que desenvolve uma cor que pode ser medida por espectrofotometria, a 560 nm (Wrolstad, *et al.* 2005). Para tal, retiram-se amostras de gordura para tubos de ensaio, adiciona-se 9,9ml de uma solução de clorofórmio/metanol na proporção de 7:3, 50 µl de indicador laranja de xilenol e 50 µl de solução de cloreto ferro (II) (junção de uma solução de cloreto de bário com uma solução de sulfato de ferro e deixa-se exposto a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para além das amostras também se prepara uma curva padrão, através da solução padrão de cloreto de ferro (III) nas concentrações de 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 ml, da qual se obtém uma equação da reta, que indica o declive, necessário para a quantificação do teor de peróxidos. Os resultados são expressos em miliequivalentes de peróxido de oxigénio por kg de gordura (n=6-12).

$$PV_{mg/kg} = \frac{(Aa - Ab) \times m}{w \times 55,84 \times 2}$$

Aa - absorvância da amostra; Ab - absorvância do branco; m - 1/declive; w - massa da amostra.

### 3.2.5.2. Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O valor do índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinado de acordo com o método de *Vyncke* (1975) com pequenas modificações (NP 3356, 2009), em filetes de sardinha para avaliar a estabilidade oxidativa durante o período de armazenamento. O método consiste na extração do aldeído malónico com 30ml de uma mistura a 7,5% de ácido tricloroacético, galato de propilo e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O extrato é filtrado e a este adiciona-se 5ml de ácido tiobarbitúrico. O ácido malónico das amostras reage com o ácido tiobarbitúrico pós incubação num banho-maria a 100<sup>o</sup>C durante 40 minutos, formando um complexo corado rosa, cuja absorvância é medida num espectrofotómetro, a 530nm. Para além da leitura da absorvância das amostras, também se lê a absorvância (530nm) de uma solução padrão, com a solução padrão TEP (1,1,3,3 – tetraetoxipropano) nos volumes de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0 ml, de onde se obtém uma equação da reta, que permite extrapolar a concentração de aldeído malónico presente em cada amostra. Os resultados são expressos como valor TBA, mg malonaldeído / Kg de produto (n=6-12).

$$TBA_{mg/Kg} = \frac{72 \times c}{m \times v} \left( 30 + \frac{mH}{100} \right)$$

c - concentração do aldeído malónico (µmol); v - volume da toma (mL); H - humidade da amostra (%); m - massa da toma de ensaio (g)

### 3.2.5.3. Avaliação Instrumental da Cor

A cor foi avaliada através das coordenadas Cielab (L\*, a\*, b\*) na superfície dos filetes de sardinha depois de descongelados (experiencia armazenados a -20<sup>o</sup>C) e nos filetes de sardinha refrigerados, usando um colorímetro, que consiste num aparelho de medição, com uma área de diâmetro 8 milímetros de medição e um processador de

dados. Antes de cada medição, o colorímetro foi calibrado por uma cerâmica branca. O valor de  $L^*$  representa luminosidade ( $L = 0$  preto,  $L = 100$  branco), o valor de  $a^*$  representa vermelho ( $+ 60 =$  vermelho,  $- 60 =$  verde) e o valor de  $b^*$  representa amarelo ( $+ 60 =$  amarelo,  $- 60 =$  azul). As medições de cor foram feitas em triplicado, na superfície de cada filete em três locais diferentes mas previamente determinados (figura 10). As medições de cor foram feitas à temperatura ambiente com iluminante  $D_{65}$  e um ângulo de  $0^\circ$ . A diferença de cor numérica total ( $\Delta E$ ) foi calculada entre os filetes no tempo zero e no tempo final de armazenamento pela seguinte fórmula:  $\Delta E_{0-6} = ((L_6 - L_0)^2 + (a_6 - a_0)^2 + (b_6 - b_0)^2)^{0,5}$ .



**Figura 10** – Avaliação de cor através do colorímetro em três locais definidos.

### 3.2.6. Análise Sensorial

#### 3.2.6.1. Teste hedônico de preferência

Quando os filetes de sardinha completaram um tempo de armazenamento de 2, 4 e 6 meses, avaliou-se a opinião do consumidor através de provas afetivas preferenciais. Os testes foram elaborados com 100 consumidores, de cada vez, com idades compreendidas entre os 18 e 50 anos, em que lhes foi distribuída uma folha de provas com a seguinte descrição: “ Imagine-se às compras numa superfície comercial e visualize os filetes de sardinha em cru apresentados, ordene por ordem de preferência qual seria a sua decisão sobre a compra do filete”. Para uma apreciação global do aspeto (aspeto visual, cor e textura) dos filetes, colocou-se um exemplar de cada grupo (C1, FT e FTR) a descongelar e elaborou-se um tabuleiro de prova, como se pode observar na figura 11. Este tabuleiro continha 3 “meios-pratos” com um filete cada e com os respetivos códigos aleatórios atribuídos.



**Figura 11** – Tabuleiro preparado para a exposição dos filetes de sardinha, para uma avaliação sensorial dos mesmos por parte de consumidores.

### 3.2.7. Análise estatística

Na experiência “armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ ”, foram retirados seis filetes de sardinha por grupo, de 2 em 2 meses, e utilizados como unidades experimentais. Todas as análises foram realizadas em duplicado em cada filete de sardinha (6 filetes de sardinha x 2 análises;  $n = 12$  por grupo, a cada 2 meses). Na experiência “armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$ ”, foram retirados três filetes de sardinha por grupo, às 0, 6, 12 e 24 horas, e utilizados como unidades experimentais. Todas as análises foram realizadas em duplicado em cada filete de sardinha (3 filetes de sardinha x 2 análises;  $n = 6$ , a cada 6/12 horas). Os resultados são expressos como médias  $\pm$  SEM e recorreu-se à análise de variância (ANOVA) pelo *Graphpad Prism Software*, para estudar o efeito da adição dos antioxidantes sobre os parâmetros medidos. Para tal, foi considerado um nível significativo de confiança quando  $p \leq 0,05$ . Utilizou-se análise por correspondência na análise dos dados relativos ao teste hedônico de preferência.

## IV. Resultados

---

---



#### 4.1. Otimização do processo de adição dos antioxidantes

Um dos objetivos deste estudo foi a otimização do processo de adição dos antioxidantes.

Segundo Andersen *et al.* (2003), os antioxidantes naturais podem-se classificar segundo o seu valor nutritivo ou segundo a sua solubilidade. A vitamina E (hidrofóbica) e a vitamina C (hidrofílica) são importantes como nutrientes, enquanto cofatores de várias enzimas, mas também enquanto antioxidantes. Os antioxidantes não nutritivos podem dividir-se de forma similar em lipossolúveis e hidrossolúveis. Deste modo a solubilidade dos antioxidantes determina a sua distribuição nas diferentes fases do alimento (lipídica e aquosa). Os antioxidantes utilizados neste estudo são ambos lipossolúveis, isto é, apenas solúveis em lípidos (gordura) e não solúveis em água. Considerando que os antioxidantes em causa teriam que se solubilizar/diluir numa substância lipídica, considerou-se o óleo de girassol como um meio para tal (pois o antioxidante mix de tocoferóis está solúvel em óleo girassol) e excluiu-se a hipótese de realizar a adição de antioxidante no banho de vidragem. Após vários ensaios preliminares de otimização, chegou-se à conclusão que seria conveniente adicionar os antioxidantes ao filete de sardinha (antes de qualquer processo de conservação) para que o filete consiga absorver/reter a solução (antioxidante em óleo de girassol) adicionada. Deste modo evitar-se-á que numa fase posterior de produção, na vidragem, a solução não se desagregue da superfície do filete.

Na decisão sobre que tecnologia de adição utilizar, imersão ou aspersão, observou-se que após imersão, o filete ficava a escorrer óleo e tornar-se-ia um produto demasiado oleoso para comercialização, para além de não garantir uma uniformidade de solução (antioxidante em óleo de girassol). Sendo assim, excluiu-se este método de imersão e ponderou-se o método por aspersão do antioxidante sobre a superfície do filete de sardinha. No entanto, este método também teve alguns problemas técnicos, pois experimentaram-se vários equipamentos, começando por equipamentos mais simples, aspersores de água e aspersores de embalagens de produtos de limpeza, e o resultado nunca era de aspersão. Pois a solução (óleo com antioxidante) sempre que era injetada, saia em forma de escorrer e não em forma de spray. Posteriormente, adquiriu-se um doseador em spray para azeite (gourmet), em que se experimentou com óleo com e sem antioxidante conseguindo-se o resultado pretendido, de aspersão. No entanto, com a rotina de produção, a cabeça do doseador em spray, devido à gordura e à densidade da

solução com antioxidante, rapidamente colapsou e danificou-se. Como alternativa, recorreu-se ao equipamento laboratorial “*spray dry*”, que conseguia a aspersão que se pretendia. No entanto, a aspersão era contínua o que era desfavorável ao processo, porque impossibilitaria a paragem da aspersão que seria necessária para se passar a outra carga de filetes. Por outro lado a quantidade adicionada era difícil de controlar entre filetes. Com o objetivo de solucionar estes problemas tecnológicos, recorreu-se a uma pistola de aspersão ligada a uma bomba de pressão, pois tinha força para executar uma aspersão perfeita de óleo, conseguia-se regular a pressão de forma a não danificar o filete, e através da pistola, conseguia-se fazer e parar a aspersão quando necessário. Neste contexto, foram estes os equipamentos selecionados para o atual estudo.

O passo seguinte foi avaliar em que condições se adicionariam os antioxidantes pelo método de aspersão. Primeiro foi avaliado a força da aspersão, depois o tempo de adição dos antioxidantes, de modo a definir a quantidade desejável de antioxidante, a capacidade de absorção e o tempo de repouso antes da ultracongelação, para conseguir absorver corretamente a solução. Para tal, experimentou-se a aspersão durante 5, 10 e 15 segundos. Observou-se que com 5 segundos o filete não adquiria a quantidade suficiente, que com 15 segundos o filete não conseguia absorver totalmente a solução ficando superficialmente “oleoso” e que com 10 segundos o filete conseguia absorver a quantidade de solução aspergida e que essa quantidade correspondia à que se pretendia adicionar (0,10 ml de solução de óleo com antioxidante/ filete de sardinha). Em relação ao tempo de repouso, verificou-se que se deixássemos os filetes em repouso durante um minuto seria o suficiente para que o filete absorve-se a solução adicionada.

O antioxidante mix de tocoferóis foi adicionado por aspersão tal qual foi fornecido comercialmente e o antioxidante mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho foi dissolvido em óleo girassol, numa concentração de 150 g/l (150 000 mg de tocoferóis/l) para se encontrar nas mesmas condições que o outro antioxidante utilizado, isto é, dissolvido (devido ao estado físico) no mesmo solvente. Assim definiu-se que o processo de adição de antioxidante seria através de aspersão, nas condições ótimas de operação descritas na tabela 4.

**Tabela 4** - Condições ótimas de operação para o processo de adição de antioxidante.

| <b>Características</b>     | <b>Condições</b>   |
|----------------------------|--|
| Método aplicado            | Aspersão   |
| Equipamento                | Pistola de aspersão e bomba de pressão   |
| Pressão                    | 30 psi   |
| Tempo de adição            | 10 segundos  |
| Tempo de repouso           | 60 segundos  |
| Quantidade aspergida       | 0,10 ml/filete   |
| Concentração de tocoferóis | 1) 54 mg de tocoferóis / 0,10 ml de antiox. mix de tocoferóis<br>2) 15 mg de tocoferóis / 0,10 ml de solução antiox. mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho |

#### **4.2. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em refrigeração**

##### *4.2.1. Caracterização dos filetes de Sardinha*

##### *4.2.1.1. Caracterização química*

Quanto maior o teor lipídico da matriz alimentar, maior é a sua suscetibilidade ao processo oxidativo (Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002). Como tal, para perceber a suscetibilidade dos filetes de sardinha ao processo oxidativo e em simultâneo conhecer a sua composição química efetuaram-se várias análises após preparação do filete, em fresco: *Kjeldahl* (NP 4488, 2009) – proteína; *Bligh & Dyer* (1959) – gordura total; AOAC, 2000 – humidade; Norma Portuguesa 2032 (2009) – cinzas. Todos os resultados foram obtidos em grama por 100 grama de produto e encontram-se representados na tabela 5.

**Tabela 5** – Composição (média  $\pm$  SEM) química dos filetes de sardinha, em g/100g de produto (n=3).

| <b>Caracterização química do filete de sardinha</b> |                 |
|---|-----------------|
|   | <b>(g/100g)</b> |
| <b>Proteína</b>                                     | 18,3 $\pm$ 0,7  |
| <b>Gordura Total</b>                                | 13,0 $\pm$ 1,4  |
| <b>Humidade</b>                                     | 63,5 $\pm$ 2,4  |
| <b>Cinza</b>  | 1,8 $\pm$ 0,1   |

Pela análise da tabela 5, verifica-se que a amostra em estudo, filetes de sardinha, tem elevado teor proteico e de humidade. Que o conteúdo de gordura total indica que a amostra utilizada no estudo possui um teor lipídico elevado, isto é, as sardinhas encontram-se gordas. O teor de cinzas é baixo.

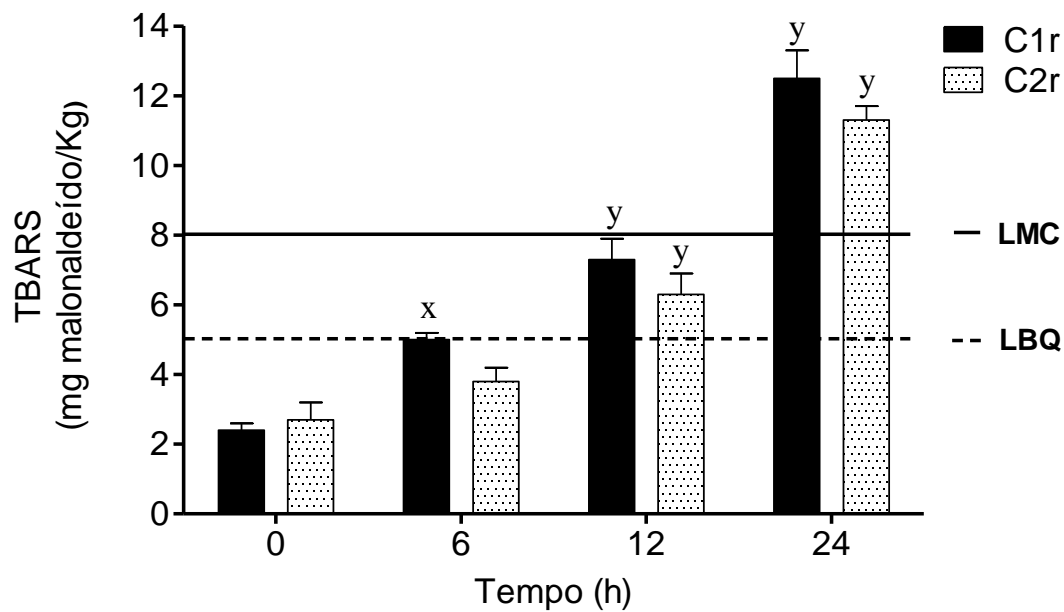
#### *4.2.2. Estabilidade oxidativa*

##### *4.2.2.1. TBARS e avaliação instrumental da cor*

Para avaliar a estabilidade oxidativa dos filetes de sardinha com a adição de tocoferóis na presença e ausência de extrato de rosmaninho, armazenado em refrigeração, efetuou-se a análise aos TBARS pelo método de *Vyncke* (1975), de modo a quantificar os produtos secundários formados, resultantes do processo oxidativo.

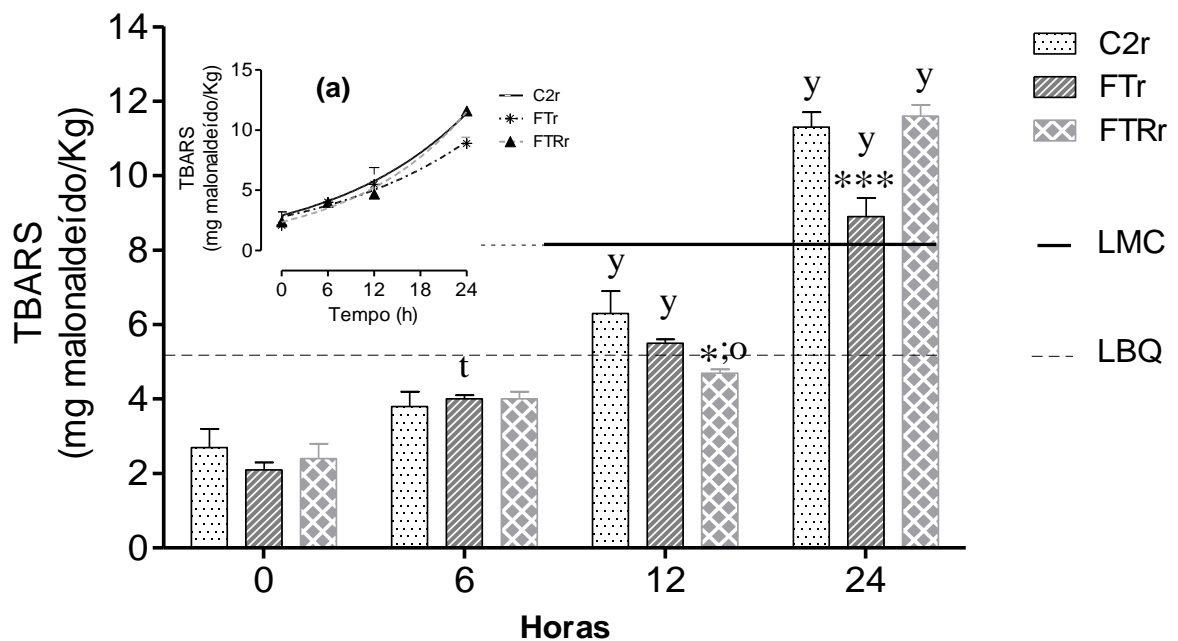
Para a análise de TBARS tem sido sugerido 5 mg malonaldeído/kg como um valor máximo de TBARS indicativo de uma boa qualidade do pescado, no entanto considera-se que o pescado pode ser consumido até um valor máximo de 8 mg malonaldeído/kg (*Ozogul, et al.*2010, b; *Nunes et al.*, 1992).

Na figura 12 encontram-se os resultados dos TBARS em filetes de sardinha na presença e na ausência da adição de óleo de girassol (veículo da adição de tocoferóis + extrato de rosmaninho), representados por C1r e C2r, respetivamente. Tal como se pode observar na figura 12, a adição de óleo de girassol não induziu alterações no perfil de oxidação lipídica (TBARS). Por esta razão na figura 13 são apresentados os resultados do efeito da adição de tocoferóis (FTr) e tocoferóis com extrato de rosmaninho (FTRr) apenas com o controlo C2r.



**Figura 12** – TBARS (mg malonaldeído/kg) em filetes de sardinha na ausência (C1r) e na presença da adição de óleo de girassol (C2r), armazenamento em refrigeração (0 - 24 horas). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6). X -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 horas); y -  $p < 0,0001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 horas). LMC – Limite Máximo admitido para o Consumo humano de pescado; LBQ – Limite máximo admitido para Boa Qualidade de pescado.

Pela observação da figura 12, verifica-se, para ambos os grupos C1r e C2r, um aumento dos valores de TBARS ao longo do tempo. Não existem diferenças entre C1r e C2r. No entanto, às 6 horas em refrigeração, os filetes de sardinha do grupo controle C1r atingiram o Limite de Boa Qualidade (LBQ) e às 12 horas atingiram o Limite Máximo para Consumo humano (LMC). Os filetes de sardinha do grupo controle C2r ultrapassaram o limite LBQ às 12 horas e o LMC às 24 horas.

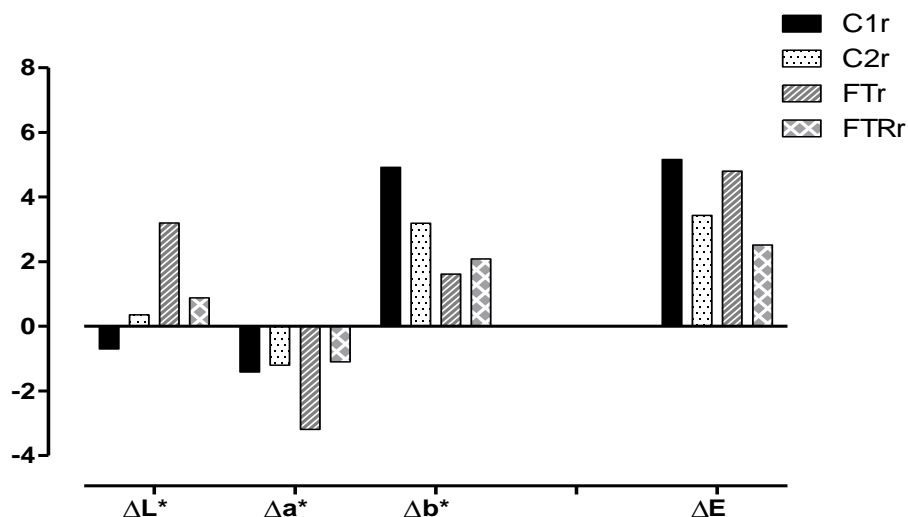


**Figura 13** – TBARS (mg malonaldeído/kg) em filetes de sardinha, armazenamento em refrigeração, tratados com óleo de girassol (C2r), com tocoferóis (FTr; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTRr; 6,5 mg/ 0,10 ml) ao longo do tempo (0 - 24 horas). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6). (a) *inset* da cinética dos TBARS ao longo do tempo. \*  $p < 0,05$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r; \*\*\* -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r. t -  $p < 0,05$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 horas); o -  $p < 0,01$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 horas); y -  $p < 0,0001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 horas)

Observando a figura 13, verifica-se um aumento dos valores de TBARS para todos os grupos, como observado na figura 12. Pela análise da figura 13, é possível verificar que até às 6 horas não existem diferenças entre os vários grupos. Às 12 horas e às 24 horas existe uma redução nos TBARS pelo efeito da adição dos tocoferóis + extrato de rosmaninho e pela adição de tocoferóis, respetivamente. No entanto, pela análise do *inset* (a) verifica-se um aumento exponencial do TBARS, sendo este mais lento no caso dos filetes tratados com tocoferóis (FTr). O LBQ foi atingido pelo os grupos C2r e FTr às 12 horas e o LMC foi ultrapassado pelos grupos C2r, FTr e FTRr após 24 horas, de armazenamento em refrigeração.

Para além da análise de TBARS, também foi avaliado a cor instrumentalmente, para verificar se o processo de oxidação provocava alterações na cor da superfície dos filetes de sardinha ao longo do tempo em que se encontravam armazenados em

refrigeração. Os resultados obtidos encontram-se apresentados pela variação dos diferentes parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), bem como a variação total de cor -  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$  e  $\Delta E^*$  (figura 14).



**Figura 14** – Variação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ) e variação total de cor ( $\Delta E^*$ ) em filetes de sardinha, armazenados em refrigeração, na ausência (C1r) e na presença da adição de óleo de girassol (C2r), com tocoferóis (FTr; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTRr; 6,5 mg/ 0,10 ml) ao longo do tempo (0 – 24 horas). Cada coluna representa o valor absoluto obtido.

Observando a figura 14, verifica-se alterações em todos os grupos, algumas positivas e outras negativas. Em relação ao  $\Delta L^*$  observa-se uma diminuição ao longo do tempo para o grupo controlo C1r e aumentos para os restantes grupos, sendo este aumento mais acentuado nas amostras FTr. No  $\Delta a^*$  observa-se uma diminuição ao longo do tempo para todos os grupos. Pelo contrário, o  $\Delta b^*$  apresenta aumentos para todos os grupos. Por fim, em relação ao  $\Delta E^*$ , observa-se uma variação elevada em todos os grupos, sendo esta variação mais evidente nos grupos C1r e FTr.

### 4.3. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em congelação

#### 4.3.1. Caracterização dos filetes de Sardinha

##### 4.3.1.1. Caracterização química

De forma a conhecer a composição química da matriz em estudo, filete de sardinha, efetuou-se uma caracterização química dos filetes. Esta caracterização foi feita após preparação do filete, em fresco, através de um conjunto de métodos analíticos: AOAC, 2000 – humidade; *Kjeldahl* (NP 4488, 2009) – proteína; *Bligh & Dyer* (1959) – gordura total; Norma Portuguesa 2032 (2009) – cinzas. Todos os resultados foram obtidos em grama por 100 grama de produto e encontram-se representados na tabela 6.

**Tabela 6** – Composição (média  $\pm$  SEM) química dos filetes de sardinha, em g/100g de produto (n=6).

| Caracterização química do filete de sardinha |                  |
|--|------------------|
|  | (g/100g)         |
| <b>Proteína</b>                              | 16,11 $\pm$ 1,87 |
| <b>Gordura Total</b>                         | 2,65 $\pm$ 0,81  |
| <b>Humidade</b>                              | 78,20 $\pm$ 2,64 |
| <b>Cinza</b>                                 | 2,60 $\pm$ 0,19  |

Os filetes de sardinha têm elevado teor proteico e de humidade. O conteúdo de gordura total indica que os filetes de sardinha utilizados no estudo têm baixo teor lipídico, isto é, ainda se encontram magras. Para avaliar a qualidade do teor lipídico proveniente dos filetes de sardinha, efetuou-se uma análise ao perfil de ácidos gordos. Esta análise é importante porque fornece informação sobre compostos que fazem parte da matriz em estudo e que são benéficos para a saúde do consumidor, como ácidos gordos da família ómega 3, por exemplo. Por outro lado, permite também avaliar a suscetibilidade deste produto à oxidação lipídica.

## 4.3.1.2. Perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi traçado através de uma análise efetuada em GC, segundo o método de *Lepage & Roy* (1986). Esta análise foi realizada em duplicado de três filetes que foram analisados após a preparação dos filetes de sardinha, tal como a caracterização química. Os resultados estão expressos em percentagem de composto e encontram-se representados na tabela 7.

**Tabela 7** – Perfil de ácidos gordos (média  $\pm$  SEM) do conteúdo lipídico de filetes de sardinha (%; n=3).

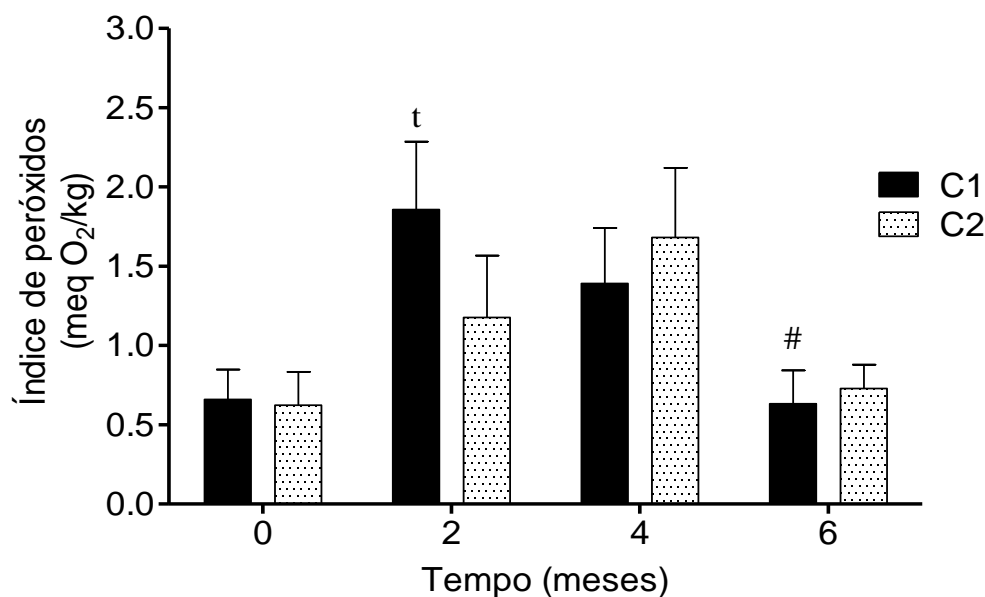
| Ácidos Gordos Livres   | Filete de Sardinha |
|------------------------|--------------------|
| C 12:0                 | 0,1 $\pm$ 0,0      |
| C 14:0                 | 6,7 $\pm$ 0,0      |
| C 16:0                 | 31,2 $\pm$ 0,5     |
| C 16:1 n7              | 0,6 $\pm$ 0,1      |
| C 16:2 n4              | 1,0 $\pm$ 0,1      |
| C 16:3 n4              | 1,1 $\pm$ 0,2      |
| C 18:0                 | 3,0 $\pm$ 0,8      |
| C 18:1                 | 8,9 $\pm$ 0,8      |
| C 18:2 n6              | 0,7 $\pm$ 0,8      |
| C 18:3 n3 + n4         | 0,6 $\pm$ 0,0      |
| C 18:4 n3              | 2,3 $\pm$ 0,1      |
| C 20:1 n9              | 2,3 $\pm$ 0,6      |
| C 20:4 n6              | 0,2 $\pm$ 0,1      |
| C 20:4 n3              | 0,3 $\pm$ 0,1      |
| C 20:5 n3              | 16,1 $\pm$ 0,5     |
| C 22:5 n3              | 2,8 $\pm$ 0,8      |
| C 22:6 n3              | 22,1 $\pm$ 0,4     |
| $\Sigma$ SFA           | 41,00              |
| $\Sigma$ MUFA          | 11,82              |
| $\Sigma$ PUFA          | 47,16              |
| $\Sigma$ $\omega$ 3    | 44,12              |
| $\Sigma$ $\omega$ 6    | 0,95               |
| $\omega$ 6/ $\omega$ 3 | 0,02               |

No perfil de ácidos gordos obtido, observa-se um conteúdo de ácidos gordos saturados (SFA) e polinsaturados (PUFA) elevado. Dos SFA, o que se encontra em maior concentração é o ácido palmítico (C16:0; 31,2%), seguido do ácido mirístico (C14:0; 6,7%). Em relação aos MUFA, a composição deste é sobre tudo de ácido oleico (C18:1; 8,9%). Os PUFA são compostos maioritariamente por ácidos gordos da família ómega 3, em especial o DHA (C22:6 n3; 22,1%) e o EPA (C20:5 n3; 16,1%).

### 4.3.2. Estabilidade oxidativa

#### 4.3.2.1. IP, TBARS e avaliação instrumental da cor

Sendo a matriz alimentar, filete de sardinha, um produto suscetível ao processo de oxidação lipídica devido ao seu conteúdo rico em ácidos gordos insaturados, realizou-se algumas análises para avaliar estabilidade oxidativa dos filetes. Após todo o processo de preparação das amostras (descrito na secção anterior – materiais e metodologia), os filetes encontravam-se armazenados em congelação e organizados por grupos (C1, C2, FT e FTR). E para se iniciar o estudo da estabilidade oxidativa, começou-se por fazer uma análise ao índice de peróxidos, os compostos primários do processo de oxidação, pelo método de Hermes-Lima *et al.* (1995). Os resultados de IP são expressos em miliequivalentes de peróxido de oxigénio por quilograma de gordura (meq O<sub>2</sub>/Kg). Os resultados do efeito da adição do óleo de girassol no IP, nos TBARS e na alteração dos parâmetros de cor, encontram-se apresentados na figura 15, 16 e 17, respetivamente.

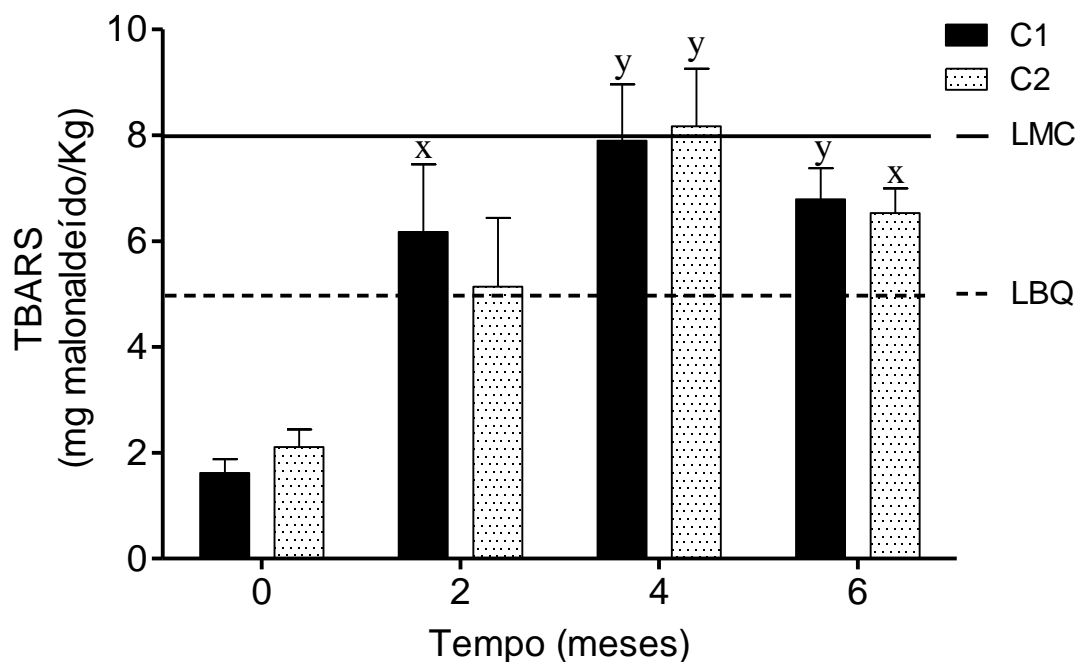


**Figura 15** – IP (meq O<sub>2</sub>/kg) em filetes de sardinha na ausência (C1) e na presença da adição de óleo de girassol (C2), armazenamento em congelação (0 - 6 meses). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6-12). t - p < 0,05, indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses); # - p < 0,05, indica diferenças significativas entre os meses 2 e 6.

Na figura 15, entre os meses 0 e 2, ocorre um aumento de IP, e entre os meses 2 e 4, uma diminuição de IP, nos filetes na ausência da adição de óleo de girassol (C1). Também se observa uma tendência semelhante, entre os meses 0 e 4 e entre os meses 4 e 6, respetivamente, nos filetes na presença da adição de óleo de girassol (C2), mas

neste caso não existem diferenças estatisticamente significativas. A adição de óleo de girassol não altera o IP ao longo do tempo.

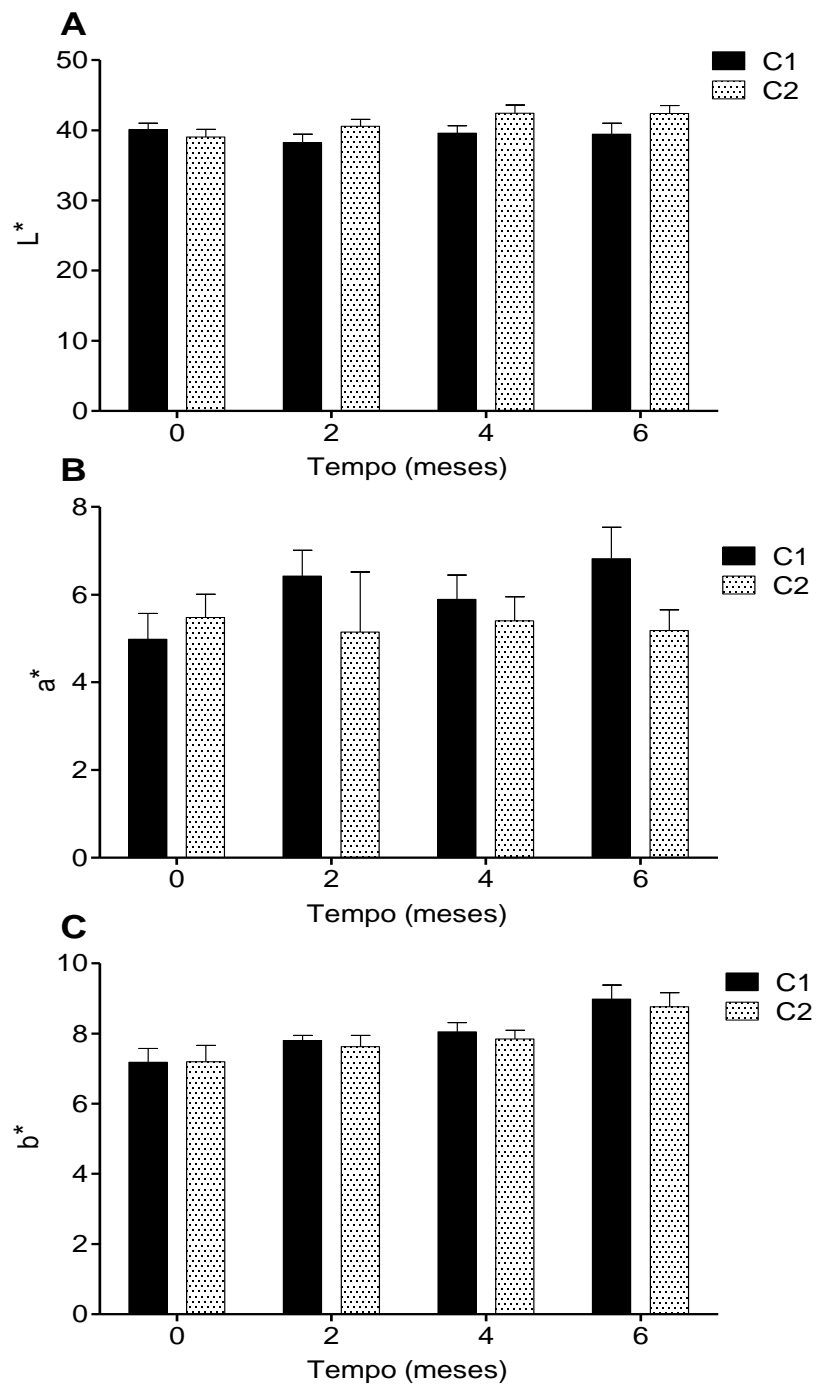
Depois, para prosseguir com o acompanhamento do processo de oxidação efetuou-se a análise aos produtos secundários resultantes do processo de oxidação, pela análise aos TBARS pelo método de *Vyncke* (1975). Os resultados são expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de produto (mg malonaldeído/Kg).



**Figura 16** – TBARS (mg malonaldeído/kg) em filetes de sardinha na ausência (C1) e na presença da adição de óleo de girassol (C2), armazenamento em congelamento (0 - 6 meses). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6-12). X -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses); y -  $p < 0,0001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses). LMC - Limite Máximo admitido para o Consumo humano de pescado; LBQ – Limite máximo admitido para Boa Qualidade de pescado.

Pela observação da figura 16, sucede-se um aumento dos TBARS até ao mês 6, para ambos os grupos de controlo C1 e C2.

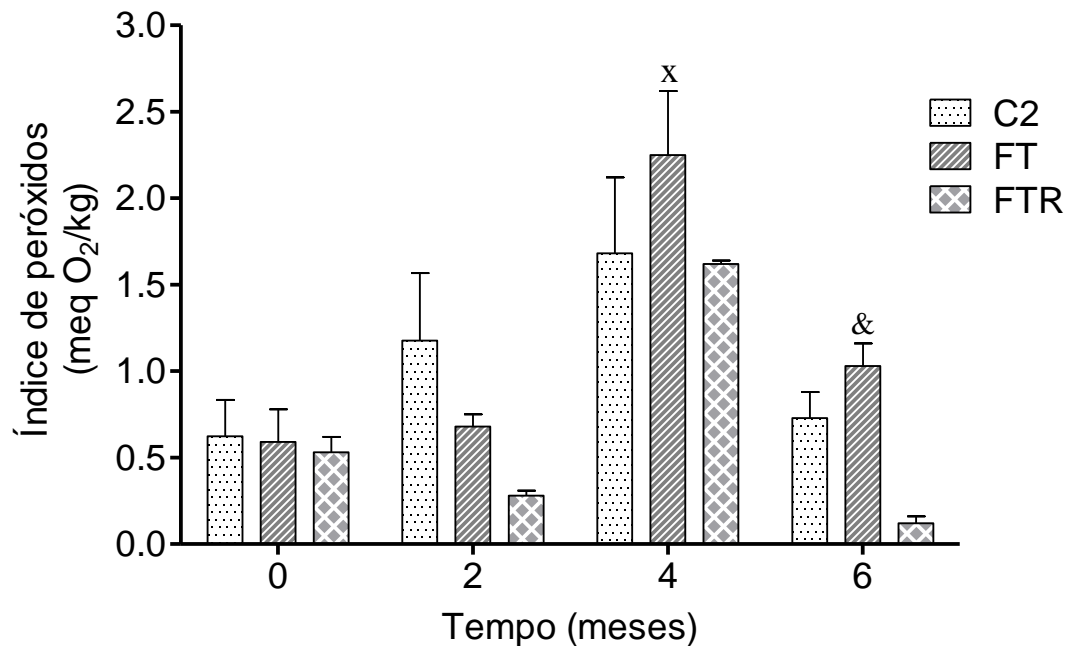
Para complementar estas duas análises anteriormente referidas, realizou-se um estudo instrumental da cor no músculo do filete sardinha, de forma a avaliar as alterações ocorridas na superfície dos filetes na presença e na ausência de óleo de girassol. Para tal, foram avaliados os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (figura 17).



**Figura 17** –  $L^*$  (A),  $a^*$  (B) e  $b^*$  (C) em filetes de sardinha na ausência (C1) e na presença da adição de óleo de girassol (C2), armazenamento em congelação (0 - 6 meses). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6-12).

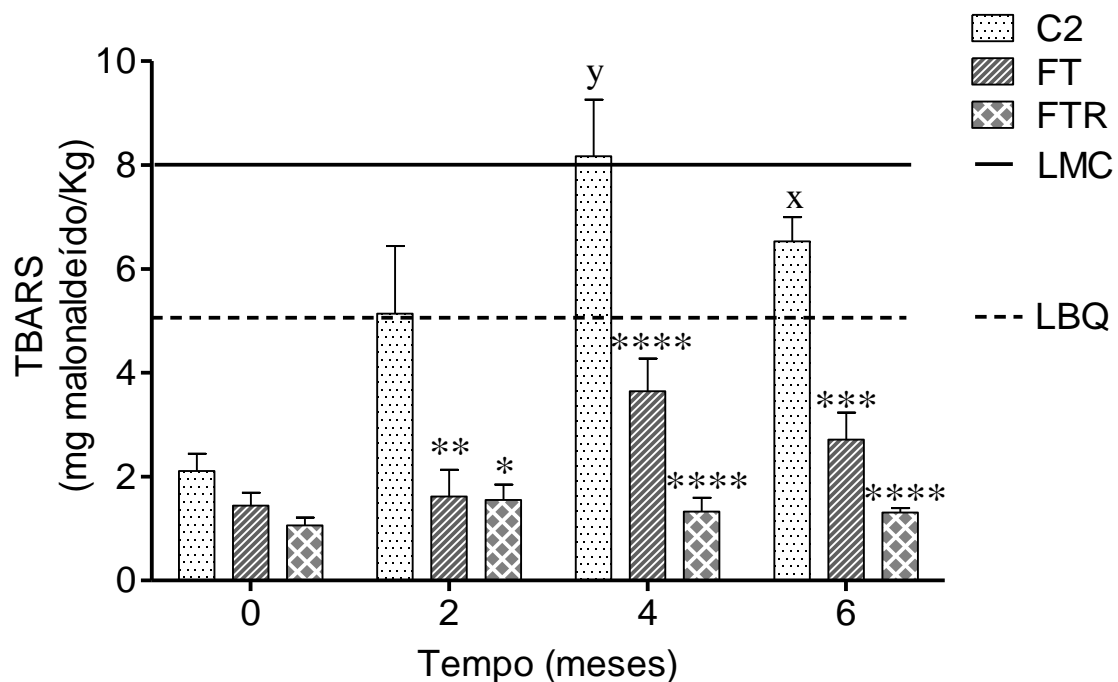
Pela análise da figura 17, verifica-se que não existem diferenças significativas ao longo do tempo para os diferentes parâmetros instrumentais da cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), para ambos os grupos de controlo (C1 e C2).

Para analisar os resultados dos grupos de estudo, FT e FTR, tendo em consideração que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os grupos de controlo, C1 e C2, efetuou-se a comparação apenas com o grupo de filetes tratados com óleo de girassol (C2) relativamente ao IP, TBARS e à cor por avaliação instrumental (figura 18, 19 e 20).



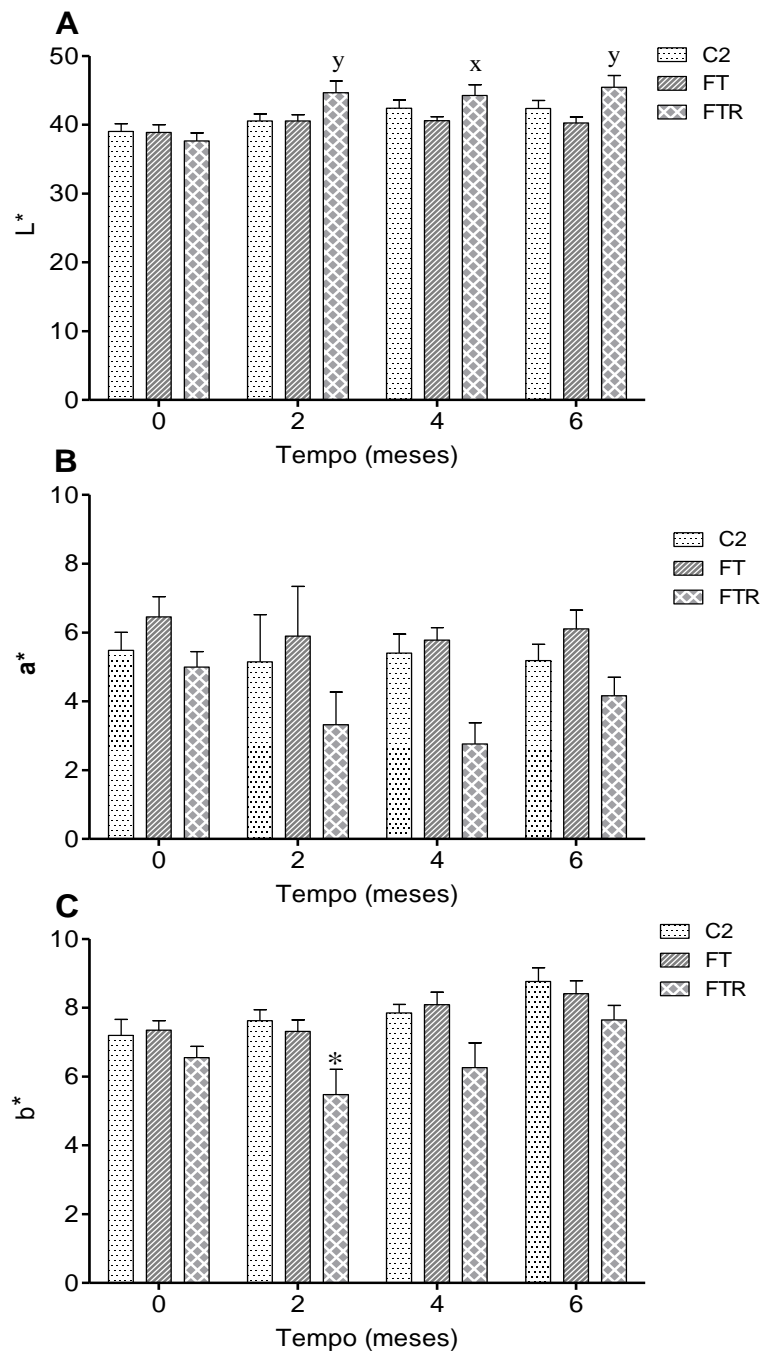
**Figura 18** – IP (meq O<sub>2</sub>/Kg) em filetes de sardinha, armazenamento em congelação, tratados com óleo de girassol (C2r), com tocoferóis (FT; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTR; 6,5 mg/ 0,10 ml) ao longo do tempo (0 – 6 meses). Cada coluna representa a média ± SEM (n=6-12). x -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses); & -  $p < 0,05$ , indica diferenças significativas entre os meses 4 e 6.

O que se observa na figura 18, é que entre os meses 0 e 4 ocorre um aumento de IP e depois uma diminuição de IP, entre os meses 4 e 6, nos filetes tratados com tocoferóis (FT). Não ocorrem diferenças estatisticamente significativas nos filetes na presença de óleo de girassol (C2) e com tocoferóis mais extrato de rosmaninho (FTR).



**Figura 19** – TBARS (mg malonaldeído/kg) em filetes de sardinha, armazenamento em congelação, tratados com óleo de girassol (C2r), com tocoferóis (FTr; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTRr; 6,5 mg/ 0,10 ml) ao longo do tempo (0 - 6 meses). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6-12). \*  $p < 0,05$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r; \*\* -  $p < 0,01$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r; \*\*\* -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r. x -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses); y -  $p < 0,0001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses). LMC - Limite Máximo admitido para o Consumo humano de pescado; LBQ – Limite máximo admitido para Boa Qualidade de pescado.

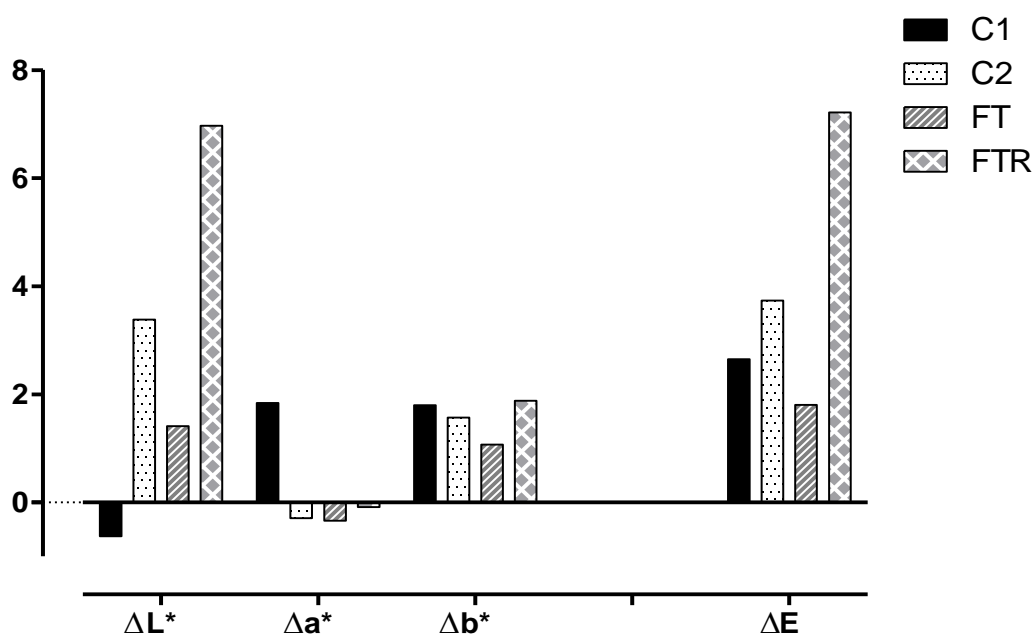
Pela observação da figura 19, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (C2, FT e FTR) no mês 0. Mas nos meses 2, 4 e 6, existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo (FT e FTR) quando comparados com o grupo de controlo (C2), devido ao seu aumento significativo de TBARS. Entre os grupos de estudo não existem diferenças estatisticamente significativas, tal como também acontece para os mesmos ao longo do tempo. O grupo de controlo atinge o LBQ no mês 2, e ultrapassa o LMC no mês 4. Os grupos de estudo foram sempre inferiores aos limites estabelecidos como de boa qualidade (LBQ).



**Figura 20** –  $L^*$  (A),  $a^*$  (B) e  $b^*$  (C) em filetes de sardinha, armazenamento em congelação, tratados com óleo de girassol (C2r), com tocoferóis (FTr; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTRr; 6,5 mg/ 0,10 ml) ao longo do tempo (0 - 6 meses). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM (n=6-12). \*  $p < 0,05$ , indica diferenças significativas em relação ao grupo de controlo C2r. x -  $p < 0,001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses); y -  $p < 0,0001$ , indica diferenças significativas em relação ao tempo inicial (0 meses).

Observando a figura 20, verifica-se igualdade de valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , entre o grupo controlo (C2) e os grupos de estudo (FT e FTR), pois não existem diferenças estatisticamente significativas. No parâmetro  $L^*$  (figura 20 (A)), observa-se um aumento de  $L^*$  para o grupo de grupo de estudo FTR, entre os meses 0 e 6. Em relação ao parâmetro  $b^*$  (figura 20 (C)), verifica-se uma diferença estatisticamente significativa no grupo FTR quando comparado com o grupo de controlo (C2), no mês 2.

De modo a avaliar a evolução dos parâmetros de cor ao longo do tempo, nos filetes armazenados em congelação, calcularam-se o  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ . A diferença total de cor ocorrida nas amostras foi calculada pelo  $\Delta E^*$ .



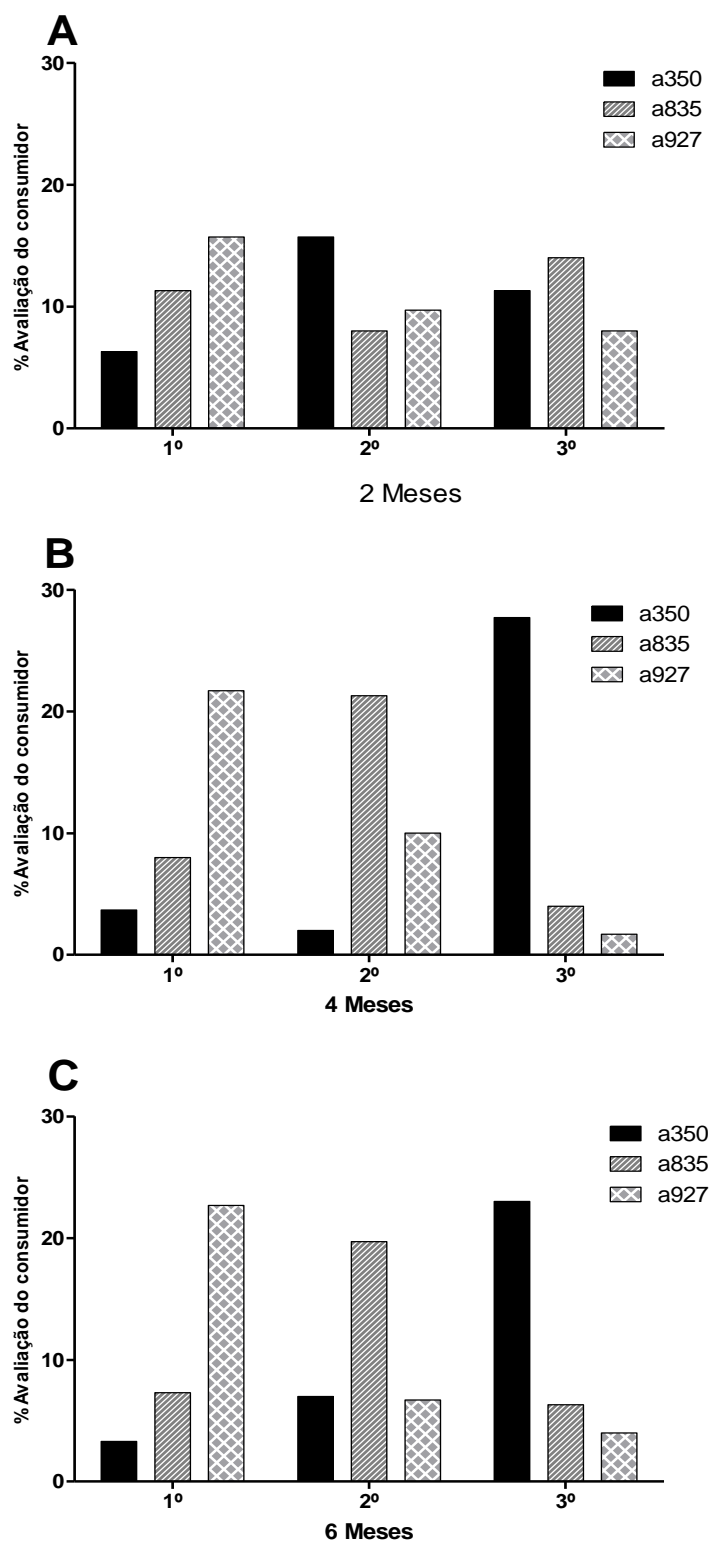
**Figura 21** – Variação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ) e variação total de cor ( $\Delta E^*$ ) em filetes de sardinha, armazenados em congelação, na ausência (C1r) e na presença da adição de óleo de girassol (C2r), com tocoferóis (FT; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTR; 6,5 mg/ 0,10 ml) ao longo do tempo (0 – 6 meses). Cada coluna representa o valor absoluto obtido.

Da análise da figura 21, verifica-se alterações em todos os grupos, algumas positivas e outras negativas. Em relação ao  $\Delta L^*$  observa-se uma diminuição ao longo do tempo para o grupo controlo C1 e aumentos para os restantes grupos, sendo o mais acentuado o grupo de estudo FTR. No  $\Delta a^*$  observa-se uma variação positiva para o grupo de controlo C1 e diminuição para os restantes grupos. No  $\Delta b^*$  observa-se variação

positiva para todos os grupos. Relativamente ao  $\Delta E^*$ , verifica-se uma variação elevada na cor em todos os grupos, sendo esta variação mais evidente no grupo de estudo FTR.

#### *4.3.3. Análise Sensorial Hedónica*

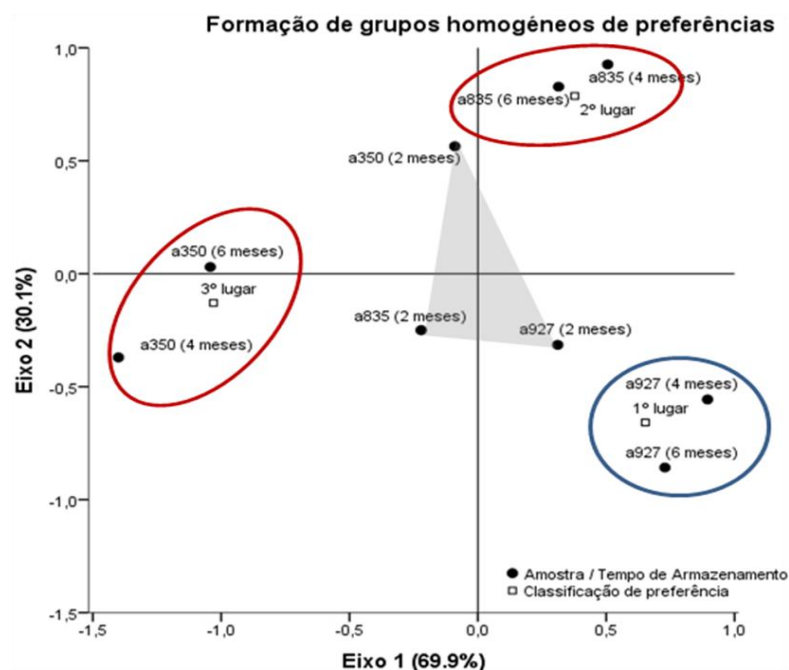
Com o objetivo de avaliar qual seria a aceitação do consumidor perante os produtos em estudo, realizou-se um teste de preferência a 100 consumidores, tendo como base de apreciação a aparência, a cor e a textura (figura 22).



**Figura 22** – Preferência do consumidor (%), 1º, 2º e 3º lugar, perante a observação de filetes de sardinha na ausência de adição de óleo de girassol (C1r), com tocoferóis (FTr; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTRr; 6,5 mg/ 0,10 ml),

aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses de armazenamento em congelação. Com um total de 100 respostas por observação. a350 – C1; a835 – FT; a927 – FTR.

Pode-se observar na figura 22 (A; B; C) a preferência por ordem decrescente (1º, 2º e 3º lugar) manifestada pelos consumidores ao final de 2, 4 e 6 meses de armazenamento dos filetes de sardinha congelados (C1, FT e FTR). Pela análise da figura 22, verifica-se que a avaliação feita nos 2 meses é menos diferenciada entre amostras, 350, 835 e 927 e que nos meses 4 e 6 as diferenças são mais acentuadas entre amostras. Aos dois meses, a amostra preferencial é a 927, seguida da amostra 350, em 2º lugar, e depois da amostra 835, em 3º lugar. No mês 4, a amostra 927 continua a ser a preferida, mas em 2º lugar fica a amostra 835, ficando em 3º lugar a amostra 350. No mês 6, a avaliação feita pelos consumidores resultou em similares escolhas que no mês 4.



**Figura 23** – Preferência do consumidor (%) em filetes de sardinha, armazenados em congelação, na ausência (C1) e na presença de adição de tocoferóis (FTr; 54 mg/0,10 ml) e com tocoferóis (15 mg/0,10 ml) + extrato de rosmaninho (FTR; 6,5 mg/ 0,10 ml), por análise de correspondência. Com um total de 100 respostas por avaliação bimensal.

Através da análise de correspondências das preferências (figura 23) pode-se observar que a amostra 927 (grupo de estudo FTR) está claramente associada ao 1º lugar, sendo esta associação mais acentuada nos meses 4 e 6. O 2º lugar é partilhado pela amostra 835, aos 6 meses e pela amostra 350, aos 2 meses. O 3º lugar é principalmente ocupado pela amostra 350, tanto aos 4 como aos 6 meses. Também se observa que aos 2 meses existe uma dúvida entre as classificações que caracterizam as amostras, mas no entanto é observada uma aproximação da amostra 350 do 2º lugar, da amostra 835 do 3º lugar e da amostra 927 pelo 1º lugar. A maior variabilidade dos dados é explicada pelo eixo 1 (69,9%), sendo determinado pelas escolhas realizadas para o 3º lugar, amostra 350 e 835 e para o 1º lugar, amostra 927. Mas as escolhas feitas para 3º lugar encontram-se em oposição às escolhas feitas 1º lugar, pois o 3º lugar encontra-se no lado negativo do eixo e o 1º lugar encontra-se no lado positivo do eixo, refletindo padrões opostos de preferência.

# V. Discussão

---

---



### 5.1. Otimização do processo de adição dos antioxidantes

Durante a investigação do método mais eficaz para adicionar antioxidante aos filetes de sardinha, considerou-se a hipótese de adicionar o antioxidante antes ou durante o processo de vidragem. Esta etapa de vidragem consiste em mergulhar os filetes congelados em água fria para que o filete adquira uma película de gelo envolvente, que tem como objetivo evitar que o produto sofra uma desidratação e alteração nos compostos proteicos e lipídicos. Sendo os antioxidantes utilizados lipossolúveis, altamente hidrofóbicos, não se dissolvendo em água, impossibilitou a utilização da água de vidragem com veículo para a adição dos antioxidantes aos filetes de sardinha. Por esta razão foram desenvolvidas experiências para adição de antioxidantes aos filetes de sardinhas por imersão e por pulverização.

No caso da imersão, a solução de antioxidante diluído em óleo girassol, devido à sua elevada densidade e falta de agitação constante, não garante uniformidade na quantidade de antioxidante adicionado aos filetes, isto é, não se consegue uma solução homogénea adicionado aos filetes de sardinha. Por outro lado, a solução fica “contaminada” pelos primeiros filetes de sardinha imergidos, contaminando (escamas, sangue e espinhas) os outros filetes imergidos a seguir. Outros dos inconvenientes deste processo é de cariz económico, já que esta técnica implicaria mais custos, quer em óleo (maior quantidade), quer em antioxidante, bem como maior desperdício da solução preparada (renovação da solução por porção de filetes de sardinha imerso). A tudo isto acresce o facto de o filete ser exposto/imerso na sua totalidade a mais uma fonte de “gordura” e apesar da capacidade antioxidante fornecida pelos antioxidantes utilizados, possivelmente ocorreria um processo oxidativo mais intenso associado à elevada quantidade de gordura adicionada. Pelo exposto anteriormente, este método “imersão” não se revelou uma metodologia eficiente, quer do ponto de vista tecnológico, quer numa perspetiva comercial e industrial.

Ponderou-se então a método por aspersão do antioxidante sobre a superfície do filete de sardinha. Com a pistola de aspersão ligada a uma bomba de pressão que demonstrou ser o ideal para o que se pretendia. Com esta técnica, conseguiu-se controlar a força para efetuar a aspersão perfeita de óleo, regular a pressão de forma a não danificar o filete, e através da utilização da pistola, conseguia-se ainda efetuar e parar a aspersão quando necessário. Através deste equipamento, realizou-se uma adição de antioxidante eficiente, rápida, controlável, rentável e com o mínimo de percas possível. Este processo tem ainda elevado potencial para desenvolvimento tecnológico de modo a o tornar automático.

## 5.2. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em refrigeração

### 5.2.1. Caracterização dos filetes de Sardinha

#### 5.2.1.1. Caracterização química

A sardinha é uma espécie que varia bastante no seu teor lipídico ao longo do ano, tendo teores mínimos no inverno, na época da desova, e máximos entre a primavera e o verão (Zlatanov, S. e Laskaridis, K. 2007). Esta variação que ocorre na composição lipídica das sardinhas está relacionada com a zona geográfica, estado sexual da espécie (Ozogul, *et al.* 2010, a), sexo, reprodução, disponibilidade alimentar, temperatura da água, salinidade e profundidade do mar (Nunes, *et al.* 2008). O teor de gordura obtido do filete de sardinha,  $13,0 \pm 1,4$  g/100g encontra-se dentro dos intervalos de teores de gordura descritos por Bandarra *et al.* (2004, b;1997,a) que indica entre 1,2 - 18,4 g/100g. Embora, para o mês de captura das sardinhas deste estudo (Junho), Bandarra *et al.* (1997,a) reporta um teor de gordura de 8,3 g/100g no ano de 1994, em Portugal. No entanto, para o mesmo mês, Zlatanov, S. e Laskaridis, K. (2007) encontrou valores de 11,47 g/100g no ano de 2005 (Grécia), facto que demonstra bem a variabilidade que pode acontecer associada à área geográfica de captura, bem como o ano da mesma. Os teores obtidos por estes autores são um pouco inferiores ao obtido neste estudo no mesmo mês do ano 2012. O que significa que a sardinha utilizada neste estudo estava gorda, com um teor lipídico um pouco superior ao que seria de esperar para a altura do ano, o que pode estar associado a um ótimo desenvolvimento da sardinha por elevada disponibilidade de alimento e um meio aquático favorável ao desenvolvimento desta espécie. Sendo as sardinhas, utilizadas gordas, isto é, com elevado teor lipídico, formaram filetes de sardinha muito suscetíveis a oxidação lipídica. Como consequência, um processo de oxidação rápido e muito avançado.

O teor proteico é mais estável que o teor lipídico e que o teor de humidade (Nunes, *et al.* 2008). O teor proteico obtido a partir dos filetes de sardinha,  $18,3 \pm 0,7$  g/100g, está de acordo com os teores reportados por Martins *et al.* (2006) e Bandarra *et al.* (2004, b) de 18,4-18,9 g/100g e 17,9 - 20,8 g/100g, respetivamente. Mas um pouco inferior ao descrito por García-Arias *et al.* (2003), 20,7g/100g. A humidade obtida dos filetes de sardinha,  $63,5 \pm 2,4$  g/100g, também está de acordo com o teor de humidade obtido por Martins *et al.* (2006), entre 63,4 - 68,9 g/100g. Mas inferior ao obtida por Bandarra *et al.* (2004, b), entre 70,7 - 77,2 g/100g, e superior à quantidade obtida por

García-Arias *et al.* (2003) 60,68 g/100g de produto. No entanto, o teor de humidade obtido neste estudo está de acordo com o que se esperava, devido ao seu elevado conteúdo lipídico, pois quanto mais gorda estiver o peixe menor o seu conteúdo em água e vice-versa (Nunes, *et al.* 2008). O teor de cinza obtido,  $1,8 \pm 0,1$  g/100g, é ligeiramente superior ao obtido por outros autores como Martins *et al.* (2006), entre 1,6 - 1,7 g/100g e por Bandarra *et al.* (2004, b), entre 1,3 - 1,5 g/100g. Mas no caso do autor García-Arias *et al.* (2003), este obteve um teor de cinzas muito superior, 3,26 g/100g de produto.

### 5.2.2. Estabilidade oxidativa

#### 5.2.2.1. TBARS

A análise aos TBARS é dos métodos usados mais antigos para avaliar o processo de oxidação lipídica em alimentos e outros sistemas biológicos (Shahidi, F. e Wanasundara, U. 2002; Raharjo & Sofos, 1993).

É um método *standard* que tem sido usado frequentemente pelos investigadores, bem como pela indústria, no entanto apresenta algumas limitações e tem sido sujeito a algumas críticas (Frankel & Meyer, 2000; Raharjo & Sofos, 1993; Ganhão *et al.* 2011). A formação de malonaldeído depende do grau de insaturação dos PUFA, isto é, quanto mais insaturados estiverem os PUFA, maior desenvolvimento de cor entre compostos, logo maior absorvância lida pelo espectrofotómetro; outros produtos secundários podem reagir no complexo MA – TBA, daí a designação de índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; o aquecimento utilizado na metodologia de determinação pode aumentar a quantidade de aldeídos formados e levar a formação de carbonilos resultantes da interação entre malonaldeído e aminoácidos, pirimidinas ou proteínas, e ainda acelerar a reação, tornando o valor de TBARS mais elevado (Osawa, *et al.* 2005).

Contudo tem sido sugerido que os valores de TBARS proporcionam excelentes meios de avaliação do estado de oxidação de um sistema biológico afetado pelas condições de armazenamento ou por variáveis de processamento (Gray & Monahan, 1992). Pikul *et al.* (1989) refere que, os TBARS devem ser usados como sendo a melhor metodologia para avaliar um grande número de amostras rapidamente e que o método de TBARS por extração, é um bom método para estimar o conteúdo em MA em amostras de músculo.

No presente estudo verifica-se uma clara tendência de aumento dos valores de TBARS para todas as situações estudadas desde das 0 horas até às 24 horas. No início, verifica-se que o grupo de controlo sujeito à adição de óleo de girassol tem um valor de

TBARS, apesar de não significativo, ligeiramente superior aos restantes grupos em análise. Este facto pode estar relacionado com o óleo de girassol adicionado que sujeito a luz e oxigénio, tenha acrescentado produtos secundários resultantes do processo de oxidação aos filetes de sardinha. Inicialmente, já se observam valores de TBARS um pouco elevados (superiores a 2 mg malonaldeído/kg) em relação aos descritos por Ozogul, *et al.* (2010, b), de 0,79 mg malonaldeído/kg, o que sugere que os filetes embora frescos, já se encontravam num estado avançado de oxidação/deterioração que pode ter sido provocada durante o manuseamento e armazenamento da sardinha após captura, através de reações autolíticas e por alguma atividade microbiana (Huss, H.H. 1997). De um modo global os filetes não tratados com antioxidantes atingiram valores de TBARS elevados ligeiramente mais rápido, o que demonstra que os antioxidantes exercem alguma atividade sob o processo oxidativo, retardando-o. Às 12 horas, os filetes tratados com tocoferóis e rosmaninho demonstraram uma atividade antioxidante clara nesta fase. No entanto, às 24 horas, o efeito conseguido anteriormente deixa de existir. Demonstrando que, entre as 12 e as 24 horas os tocoferóis e o rosmaninho perderam a capacidade de prevenção da oxidação lipídica. Durante este período é ainda possível que exista atividade pró-oxidante por parte do antioxidante mix de tocoferóis com extrato de rosmaninho adicionado. Na realidade os antioxidantes extraídos de plantas podem mostrar atividade pró-oxidante em baixa concentração e atividade antioxidante em concentrações elevadas, embora também possam exercer atividade pró-oxidante em concentrações elevadas e atividade antioxidante em concentrações baixas, a ação que exerce depende de fatores externos como temperatura e tempo de armazenamento (Moure *et al.* 2001). Por outro lado, quando se utilizou uma concentração superior de tocoferóis, na ausência de rosmaninho, existe um efeito de prevenção claro às 24 horas, facto que também é observável pela diminuição da cinética da evolução da oxidação lipídica associada à determinação dos TBARS. Os nossos resultados encontram-se, de algum modo, de acordo como o demonstrado por Ozogul *et al.* (2010, b), que refere que filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*) refrigerados e embalados a vácuo, tiveram uma prevenção na oxidação lipídica na presença de antioxidantes com extrato de rosmaninho. Estes resultados foram demonstrados porque o valor de TBARS não aumentou significativamente para os grupos tratados com antioxidantes, ao contrário do grupo de controlo que aumento significativamente.

No estudo feito por Ozogul, *et al.* (2010, b), referido anteriormente, este conseguiu demonstrar que os filetes de sardinha após 20 dias de armazenamento a 4°C, ainda não tinham ultrapassado o limite estabelecido como máximo de consumo, de 8 mg

---

---

malonaldeído/kg. No nosso estudo, este valor foi ultrapassado em 24 horas de armazenamento à mesma temperatura. Este facto é justificado pela utilização de embalagem a vácuo pelo autor, privando a amostra de oxigénio. No caso do presente estudo, os filetes estavam expostos ao ar e à luz, apenas utilizando a temperatura como fator conservador, logo disponibilizando condições para um processo oxidativo mais acelerado.

#### 4.2.2.2. Avaliação instrumental da cor

Segundo Ganhão, *et al.* (2010, b) a perda de intensidade na cor vermelha da carne crua fresca está associado ao armazenamento em baixas temperaturas, como evidência de perda de qualidade ou indício de deterioração. A mioglobina é uma proteína globular muscular importante no armazenamento de oxigénio, contendo como grupo prostético o grupo-heme, sendo um dos principais contribuintes para a cor do músculo, dependendo dos seus derivados e da sua concentração. Como tal, a estabilidade da mioglobina afeta a cor da carne (Yin & Faustman, 1993). A hemoglobina perde-se com o manuseamento e armazenamento dos produtos, enquanto que a mioglobina é retida pela estrutura muscular intracelular, por isso as alterações de cor são resultado de reações entre mioglobina com componentes musculares, como proteínas miofibrilares. A manipulação e armazenamento do peixe induz alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas, ocorrendo por consequência, descoloração (Chaijana, *et al.* 2005). A formação de metamioglobina está correlacionada com oxidação de lípidos (Yin & Faustman, 1993). A metamioglobina cruza ligações com a miosina na presença de peróxidos de hidrogénio (Chaijana, *et al.* 2005).

Segundo Faustman *et al.* (2010), músculos que demonstrem maior estabilidade de cor, caracterizam-se por terem menor consumo de oxigénio e por ocorrer menos oxidação lipídica.

No nosso estudo, não houve diferenças estatisticamente significativas ao longo das 24 horas, para todos os grupos em análise para os parâmetros L\*, a\* e b\* (resultados não apresentados). Estes resultados foram, de algum modo, surpreendentes, em particular no parâmetro a\*, onde seria esperado observar-se uma diminuição acentuada ao longo do tempo, em particular no grupo sem antioxidantes. No entanto, a ausência de feitos pode estar relacionada com as lavagens a que os filetes foram sujeitos durante a sua preparação, retirando parte das proteínas com grupo heme. Na realidade em peixe fresco, é frequente que as proteínas com grupo heme sejam removidas por lavagem dos músculos, quando eviscerado e filetado. Esta lavagem leva a uma palidez e brancura da

carne. No entanto, as proteínas heme tornam-se menos solúveis quando o peixe já se encontra em degradação (Chaijana, *et al.* 2005). Este autor reporta que alguns pigmentos, especialmente mioglobina e hemoglobina foram removidos com ciclos de lavagem com água destilada e solução salina, causando uma perda de intensidade do vermelho natural do músculo do peixe fresco.

Nos grupos de estudo, não seria de esperar diferenças muito acentuadas pelo efeito dos antioxidantes sob os filetes de sardinha. Em relação ao  $\Delta L^*$  observa-se uma variação negativa para os filetes não tratados (C1r), que significa que as amostras após 24 horas estavam mais escuras que as amostras às 0 horas (HunterLab, 2008). Os restantes grupos analisados apresentaram, variações de  $\Delta L^*$  positivas, o que significa que as amostras após 24 horas de armazenamento em refrigeração encontravam-se mais brilhantes que as amostras iniciais. Este facto foi mais evidente para os filetes tratados com tocoferóis (FTr). Na variação dos valores de  $a^*$  ( $\Delta a^*$ ) observa-se variação negativa para todos os grupos analisados, ao contrário do  $\Delta b^*$  que se observa uma variação positiva para todos os grupos. Segundo HunterLab (2008), um  $\Delta a^*$  negativo indica que as amostras após as 24 horas de armazenamento estavam a perder os tons vermelhos para adquirir tons esverdeados, e que  $\Delta b^*$  positivos indica que as amostras após 24 horas de armazenamento estavam a adquirir um tom mais amarelado que as amostras às 0 horas. A tendência de perda da cor vermelha poderá estar relacionada com alguma oxidação de hemoglobina, e aumento de valores de  $b^*$  por aumento de coloração amarelada, como característica do processo oxidativo. Em relação ao valor de  $\Delta L^*$ , os resultados podem estar relacionados com a perda de humidade por deterioração do músculo dos filetes, que se traduzirá numa perda de brilho. Este facto é visível no grupo de controlo (C1r), o mais oxidado. Pelo contrário, o valor de  $\Delta L^*$  apresentou uma diferença mais positiva no grupo de estudo tratado com tocoferóis (FTr), o menos oxidado.

De acordo com Francis e Clydesdale (1975), as modificações de cor medidas instrumentalmente podem ser detetadas visualmente, quando os valores de  $\Delta E^*$  são superiores a 2. Assim as intensas alterações de cor registadas no presente estudo seriam detetadas pelo consumidor e, provavelmente, interpretadas como deterioração da cor. A variação total de cor apresentou valores detetáveis pelos consumidores para todos os grupos estudados, sendo esta variação mais evidente nos grupos controlo (C1r) e no grupo de filetes tratados com tocoferóis (FTr). Em relação ao grupo de controlo, está de acordo com o que se esperava, sendo este grupo o que sofreu mais oxidação e como tal, mais alterações na superfície do filete. Mas o facto do grupo de estudo tratado com

tocoferóis (FTr) ter um valor de  $\Delta E^*$  elevado não está diretamente correlacionado com o processo de deterioração que sofreu, já que este grupo que atingiu valores menos elevados de TBARS. Este resultado pode estar de algum modo relacionado com a cor intrínseca associada aos tocoferóis (ao antioxidante usado na sua forma comercial –mix de tocoferóis).

### **5.3. Avaliação da estabilidade oxidativa em filetes de sardinha suplementados com tocoferóis na presença e ausência de extrato de Rosmaninho: armazenados em congelação**

#### *5.3.1. Caracterização dos filetes de Sardinha*

##### *5.3.1.1. Caracterização química*

A sardinha é uma espécie que varia bastante no seu teor lipídico ao longo do ano, tendo teores mínimos no inverno, na época da desova, e máximos entre a primavera e o verão (Zlatanov, S. e Laskaridis, K. 2007). O teor de gordura obtido do filete de sardinha,  $2,65 \pm 0,81$  g/100g de produto, está aproximado com o teor obtido por Tokur, *et al.* (2006) de  $2,18$  g/100g e encontra-se dentro dos intervalos de teores de gordura descritos por Bandarra *et al.* (2004, b;1997,a) que indica entre  $1,2 - 18,4$  g/100g. Mas não se encontra dentro dos intervalos descritos por Zlatanov, S. e Laskaridis, K. (2007) que refere um intervalo entre  $3,88 - 11,86$  g/100g. Por outro lado, para o mês de captura das sardinhas deste estudo (Junho), Bandarra *et al.* (1997,a) reporta um teor de gordura de  $8,3$  g/100g no ano de 1994, em Portugal, e Zlatanov, S. e Laskaridis, K. (2007) reporta de  $11,47$  g/100g no ano de 2005, na Grécia. Os teores obtidos por estes autores são bastante superiores ao obtido neste estudo no mesmo mês do ano 2011. O que permite afirmar que a sardinha utilizada neste estudo estava magra, com um teor lipídico muito inferior ao que seria de esperar para a altura do ano, o que pode estar associado a um atraso no desenvolvimento da sardinha por pouca disponibilidade de alimento, maturação sexual ou o meio aquático não se encontrava favorável ao desenvolvimento desta espécie.

O teor proteico é mais estável que o teor lipídico e que o teor de humidade (Nunes, *et al.* 2008). O teor proteico obtido a partir dos filetes de sardinha,  $16,11 \pm 1,87$  g/100g, é inferior aos teores citados por Martins *et al.* (2006), Bandarra *et al.* (2004, b) e García-Arias *et al.* (2003), de  $18,4-18,9$  g/100g,  $17,9 - 20,8$  g/100g e  $20,7$ g/100g, respetivamente. A humidade obtida dos filetes de sardinha,  $78,20 \pm 2,64$  g/100g, é

superior à obtida por Martins *et al.* (2006), entre 63,4 - 68,9 g/100g, à obtida por Bandarra *et al.* (2004, b), entre 70,7 - 77,2 g/100g, e à quantidade obtida por García-Arias *et al.* (2003) de 60,68 g/100g de produto. É natural que o teor de humidade obtido nos filetes em estudo seja superior aos referidos por outros autores, porque em contrapartida as suas amostras também eram mais favorecidas em teor lipídico, e quanto mais gordo estiver o peixe menor o seu conteúdo em água e vice-versa. Esta variação é mais evidente em época de desova, em que ocorre um desgaste das reservas energéticas e um aumento de água nos tecidos (Nunes, *et al.* 2008). O teor de cinza obtido,  $2,60 \pm 0,19$  g/100g, também é superior ao obtido por outros autores. Por exemplo, Martins *et al.* (2006) e Bandarra *et al.* (2004, b) encontraram variações do teor de cinzas entre 1,6 - 1,7 g/100g e já 1,3 - 1,5 g/100g, respetivamente. Pelo contrário, García-Arias *et al.* (2003) obteve um teor de cinzas superior, 3,26 g/100g de produto.

#### 5.3.1.2. Perfil de ácidos gordos

A quantidade e perfil de ácidos gordos variam notavelmente de espécie para espécie de pescado. No filete de sardinha, os SFA encontrados perfizeram 41% do total de ácidos gordos, sendo o mais abundante o ácido palmítico (31,2%), seguido do ácido mirístico (6,7 %). Em relação aos MUFA, estes compõem 11,82% do total e são constituídos maioritariamente por ácido oleico (8,9%). Os PUFA perfazem um total de 47,16%, sendo compostos maioritariamente por ácidos gordos da família ómega 3 (44,12 %), em especial o DHA (22,1%) e o EPA (16,1%). Os ácidos gordos com maior percentagem no perfil de ácidos gordos são o ácido palmítico (31,2%) e o DHA (22,1%), este facto encontra-se de acordo com estudos realizados em sardinha por Zlatanov, S. e Laskaridis, K. (2007) e por García-Arias *et al.* (2003), mas em desacordo com o estudo de Bandarra *et al.* (1997,a), que reporta que o EPA é o ácido gordo maioritário, mesmo em relação ao ácido palmítico durante grande parte do ano. De acordo com a literatura os PUFA, nesta espécie, estão em percentagens superiores que os SFA (Zlatanov, S. e Laskaridis, K. 2007; García-Arias *et al.* 2003; Bandarra *et al.* 1997,a). Em todos os casos reportados não existe uma diferença muito acentuada entre SFA e PUFAs, com exceção dos resultados obtidos no estudo de Bandarra *et al.* (1997,a), que demonstra uma diferença de quase o dobro da quantidade de PUFAs. A quantidade de PUFA determinada pode ser resultado da influência de fatores genéticos e períodos de pesca, tal como fatores intrínsecos ao próprio peixe e fatores nutricionais, que modifiquem a composição química do peixe. É sugerido que nutricionalmente, uma dieta rica em zooplâncton e fitoplâncton influencie dramaticamente a composição do perfil de ácidos gordos. Do mesmo modo, a atividade reprodutiva, a maturação sexual e ainda a

temperatura do mar têm um papel preponderante no perfil de ácidos gordos. Sendo os PUFA, fundamentais para o bom funcionamento das membranas e das funções celulares dos peixes, as temperaturas relativamente baixas no mar, favorecem a síntese destes (Caponio *et al.* 2004). Os PUFA em particular o DHA e o EPA sofrem muitas variações durante o ano, segundo Bandarra *et al.* (1997,a) no mês de Abril foi observada uma diminuição acentuada de DHA e um aumento, proporcional, de EPA. Este aumento de EPA julga-se que seja resultado da dieta, e que a diminuição de DHA seja resultado do seu importante papel nas membranas estruturais lipídicas. Caponio *et al.* (2004), do Departamento de Saúde e Segurança social do Reino Unido, sugere que o ideal de consumo da razão total de PUFA com o total de SFA deve ser, no mínimo, de 0,4, com o propósito de diminuir risco de doenças cardiovasculares. Os filetes de sardinha em estudo continham um rácio total PUFA/total SFA de 1,2, sendo, deste modo, um alimento de excelência nutricional se atentarmos o potencial quanto à diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Em relação às famílias de ácidos gordos do tipo ómegas, os filetes apresentaram ómega 3 em níveis 46 vezes mais elevados que a família de ómega 6. A razão  $\omega_6/\omega_3$  resultou em 0,02, uma razão semelhante à descrita (0,04) por García-Arias *et al.* (2003) .

### 5.3.2. Estabilidade oxidativa

#### 5.3.2.1. Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos (IP) foi determinado por um método espectrofotómetro baseado na capacidade dos peróxidos em oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ , a pH baixo. O ião férrico forma um complexo com o laranja de xilenol, cuja concentração pode ser determinada espectrofotometricamente. Esta reação de oxidação dá-se muito rapidamente, requerendo apenas uma pequena amostra e consegue-se determinar IP tão baixos como 0,1 meq  $\text{O}_2/\text{Kg}$ . Sendo esta uma das vantagens deste método em relação ao método por titulação iodométrica (Wrolstad, *et al.* 2005).

Os peróxidos atribuem relativamente pouco cheiro, sabor e cor aos produtos alimentares, mas podem-se degradar e originar os chamados produtos secundários de oxidação (Raharjo & Sofos, 1993). A sua determinação é limitada devido à estabilidade dos seus compostos, mas são importantes para estudar o comportamento do processo oxidativo. Pois pela sua formação consegue-se antever a formação de compostos desfavoráveis ao produto alimentar, como os compostos secundários. O teor de peróxidos aumenta apenas quando a taxa de formação de peróxidos é superior à sua

taxa de degradação. Quando a taxa de degradação dos peróxidos é tão ou mais rápida que a taxa de formação, o índice de peróxidos não é um bom indicador de oxidação lipídica. Em produtos onde o ferro é muito ativo a repartição de peróxidos é bastante rápida (Wrolstad, *et al.* 2005). Segundo Wrolstad, *et al.* (2005) o tempo para atingir um determinado valor de IP pode ser utilizado como índice de estabilidade oxidativa. O uso de antioxidantes é frequentemente monitorizado assim, isto é, se demorar mais tempo a atingir um determinado valor de IP, significa que o aditivo tem boa atividade antioxidante. Por outro lado, um IP baixo representa um processo de oxidação no início ou um processo de oxidação bastante avançado, porque um IP baixo, durante período de armazenagem, pode ser resultado de uma elevada taxa de degradação de peróxidos em produtos secundários.

O valor inicial de IP foi de  $0,66 \pm 0,19$  meq  $O_2$ /Kg. Entre os grupos de controlo C1 e C2 não houve diferenças estatisticamente significativas, o que seria de esperar visto que ambos não tinham adição de antioxidante, logo nada que pudesse retardar o processo. Apenas poderia haver uma diferença pela adição de óleo de girassol, sendo um composto lipídico, seria ainda mais suscetível a oxidação, mas devido à sua quantidade mínima (0,010 ml) não teve impacto sobre o produto/processo oxidativo. O grupo de controlo C1 aumentou o valor de IP do mês 0 até ao mês 2 e foi diminuindo do mês 2 até ao mês 6. O grupo de controlo tratado com óleo de girassol (C2), aumentou, tendencialmente, o valor de IP do mês 0 até ao mês 4 e ocorreu uma diminuição do mês 4 até ao mês 6. Este facto está de acordo com o esperado, isto é, primeiro houve uma taxa de formação, destes compostos, superior à taxa de degradação e por fim, começou a haver uma taxa de degradação superior à taxa de formação de peróxidos indicando um estado de oxidação mais avançado. Para além disso, os valores de IP com uma taxa de degradação de peróxidos mais elevada que a taxa de formação, foram atingidos mais depressa para o grupo de controlo C1 (2 meses) do que para o grupo de controlo C2 (4 meses). Tal facto sugere que o óleo de girassol adicionado aos filetes de sardinha, em vez de acelerar o processo de oxidação, serviu como uma proteção a fatores externos favoráveis ao processo de oxidação. Um comportamento de evolução de valores de IP semelhante ao do grupo de controlo C2, observou-se nos grupos de estudo tratados com tocoferóis (FT) e tratados com tocoferóis e rosmaninho (FTR). O grupo de estudo FT tem um aumento de IP entre os meses 0 e 4, e uma diminuição de IP, entre os meses 4 e 6. Por outro lado, no grupo de estudo FTR, apesar de se observar uma tendência, não existem diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo. Apesar destas observações, os grupos de estudo quando comparados com o grupo de controlo C2, não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O grupo de estudo FT atingiu o valor máximo de IP, quando comparado com os outros grupos em análise,  $2,25 \pm 0,37$  meq  $O_2$ /Kg. Mesmo não existindo diferenças significativas entre os grupos de controlo e os grupos de estudo comparados com os grupos de controlo, observam-se tendências que demonstram que houve um retardamento das fases de iniciação e propagação do processo oxidativo para os grupos de estudo FT e FTR. Segundo Ozogul, *et al.* (2010, b), os valores de IP inferiores a 5 meq  $O_2$ /Kg, podem ter dois significados: ou a gordura é fresca ou os peróxidos degradam-se em produtos secundários. Enquanto que os valores de IP entre 5 e 10 meq  $O_2$ /Kg, significam que o produto já contém compostos de ranço. Durante os 6 meses em que foram determinados valores de IP, nunca foram ultrapassados 3 meq  $O_2$ /Kg, logo segundo os resultados de IP, inicialmente a gordura era fresca e mais tarde, os compostos primários degradaram-se em secundários e não havia compostos de ranço.

Num estudo realizado por Maqsood, S. e Benjakul, S. (2009), de uso de compostos fenólicos na estabilidade oxidativa em óleo de peixe, armazenado em refrigeração, também se observou o efeito retardante no processo oxidativo por atividade dos antioxidantes na formação de IP. Segundo Selmi, *et al.* (2011), foi relatado que 100ppm de  $\alpha$ -tocoferol é a concentração máxima para que este aditivo tenha atividade antioxidante em óleos de peixe, embora quando utilizado em concentrações mais elevadas exerça um efeito pró-oxidante. Porque os tocoferóis ou os seus radicais são capazes de sofrer reações laterais além dos radicais livres quelantes, e sendo por esta via capazes de exercer efeitos pró-oxidantes. Tem sido relatado o envolvimento de peróxidos de  $\alpha$ -tocoferol formados da reação com um singleto de oxigénio, que gera radicais livres que agem como pró-oxidante na oxidação de PUFAs (Selmi, *et al.* 2011).

Os resultados obtidos por Ozogul, *et al.* (2010, b), em filetes de sardinha (*Sardina aurita*) embalada a vácuo com antioxidante com extrato de rosmaninho armazenados congelação são diferentes dos resultados obtidos no presente estudo. Mas as conclusões retiradas dos resultados em ambos os casos são semelhantes. No estudo referido foram observadas diferenças significativas entre o controlo e os grupos de estudo, mas não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados. Obteve um valor máximo de 12,98 meq  $O_2$ /Kg para o controlo e nas suas amostras, após um período de armazenamento, também houve um decréscimo dos valores de IP, detetado no sexto mês de armazenamento. Concluiu deste modo que o antioxidante exercia atividade sob o processo de oxidação retardando-o.

### 5.3.2.2. TBARS

Em pescado, quando é feito um corte visceral e o peixe é filetado, torna o peixe mais vulnerável ao processo oxidativo, sendo este facto potenciado pelo contacto com superfícies compostas por ferro, por exemplo pelo aumento da formação de malonaldeído. Amostras de gordura subcutânea de cavala (*Scomber scombrus*) armazenada em congelação durante dois meses, apresentaram valores de TBA oito vezes superior que os seus músculos brancos e vermelhos, submetidos às mesmas condições (Osawa, *et al.* 2005).

Ozogul, *et al.* (2010, a), afirma que o grau de degradação de lípidos no peixe congelado é dependente das espécies de peixes e do tipo de músculo, escuro ou branco. A oxidação lipídica prossegue na seguinte ordem decrescente: pele, músculo escuro e musculo branco.

No presente estudo verifica-se que nos grupos de controlo C1 e C2, ocorre um aumento de valores de TBARS do mês 0 até ao mês 4 e depois uma diminuição do mês 4 até ao mês 6. Nos filetes tratados com tocoferóis e com tocoferóis mais rosmaninho não se observaram aumentos dos valores de TBARS, mas foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos de estudo (FT e FTR) quando comparados com os grupos de controlo. Demonstrando assim que ambos os antioxidantes exerceram efeito antioxidante sob o processo oxidativo nos filetes de sardinha. Nos grupos de controlo, entre os meses 4 e 6, ocorreu uma diminuição dos valores de TBARS, facto que estará, provavelmente, associado à degradação dos compostos secundários em produtos terciários ou uma diminuição de formação de malonaldeído.

Segundo Mendes *et al.* (2009), a redução dos níveis de malonaldeído, após um tempo de armazenamento está relacionada com a interação entre o malonaldeído e moléculas nucleofílicas do músculo do peixe, levando à formação de compostos terciários da oxidação. Mendes *et al.* (2009), formulou uma hipótese em que o aumento do conteúdo inicial de malonaldeído está relacionado com um processo de oxidação a uma taxa lenta, com umas quedas intermediárias resultantes da mesma taxa do processo de oxidação lenta associada a um aumento da degradação do malonaldeído em produtos terciários. E por fim, um abrandamento da taxa de formação de malonaldeído, havendo um declínio novamente de valores de TBARS. Este autor (Mendes, *et al.* 2009), ainda menciona que as elevadas taxas de formação de malonaldeído podem estar associadas a uma maior libertação de ferro livre e outros pró-oxidantes do músculo do peixe, que se degrada cada vez mais, quanto maior o tempo de armazenamento.

Neste estudo, o valor de TBARS inicial foi de  $1,61 \pm 0,26$  mg malonaldeído/kg. E o valor máximo atingido foi pelo grupo C2 ao mês 4 de  $8,17 \pm 1,09$  mg malonaldeído/kg. No entanto os grupos de estudo FT e FTR não ultrapassaram  $3,65 \pm 0,63$  mg malonaldeído/kg, mantendo o grupo de estudo FTR os valores de TBARS sempre inferiores a 2 mg malonaldeído/kg. Deste modo, verificou-se que os grupos controlo ultrapassam o LMC e os grupos de estudo ficaram sempre muito abaixo dos valores de indicado como LBQ. Isto significa que os filetes de sardinha dos grupos de estudo, ao longo dos 6 meses de armazenamento em congelação, nunca deixaram de estar com boa qualidade para o consumidor.

Ozogul, *et al.* (2010, b), no seu estudo em filetes de sardinha (*Sardina aurita*) congelada embalada a vácuo com extrato de rosmaninho, obteve um valor inicial de TBARS de 0,79 mg malonaldeído/kg. Durante 6 meses em congelação sempre houve uma tendência para o aumento dos valores de TBARS, tendo aumentos mais acentuados no grupo de controlo até 9,23 mg malonaldeído /kg. Este grupo de controlo teve diferenças significativas com os grupos de estudo, que obtiveram valores que não passaram dos 2,79 mg MA/kg. Nos grupos de tratamento observou-se uma ligeira diminuição dos valores de TBARS entre os meses 2 e 4. O autor julga resultar da interação de malonaldeído com produtos de decomposição das proteínas em produtos terciários, como já outros autores referiram. Este autor conclui que as amostras de filetes tratadas com antioxidante nunca indicaram ranço oxidativo durante todo o tempo de armazenamento, com exceção do controlo. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os resultados deste autor.

#### 5.3.2.3. Avaliação instrumental da cor

A manipulação e armazenamento do peixe induzem alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas, ocorrendo por consequência, descoloração. Como o caso da descoloração que ocorre no atum, durante o armazenamento em congelação, por formação de metamioglobina (Chaijana, *et al.* 2005). A formação de metamioglobina está correlacionada com oxidação de lípidos (Ganhão, *et al.* 2010, b).

O valor de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  inicial foi de  $40.09 \pm 0.94$ ,  $4.98 \pm 0.59$  e  $7.19 \pm 0.39$ , respetivamente. Entre os grupos de controlo C1 e C2 não houve diferenças estatisticamente significativas para os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Isto indica que a adição de óleo de girassol, o veículo para a adição dos antioxidantes, não produziu alterações de cor nos filetes. Entre os grupos de estudo FT e FTR também não existem diferenças estatisticamente significativas entre eles ao longo dos 6 meses de armazenamento, para

os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Também não existem diferenças significativas entre o grupo de controlo C2 e os grupos de estudo para os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , com a exceção do grupo de estudo FTR com o grupo de controlo C2, no valor de  $b^*$  no mês 2. Os resultados esperados seriam uma estabilidade dos valores de  $L^*$ , considerando que os filetes deveriam ter uma luminosidade estável, uma diminuição dos valores de  $a^*$ , porque este parâmetro é indicador de perda de qualidade e/ou deterioração resultante do processo de oxidação lipídica e um ligeiro aumento do valor de  $b^*$ , devido a alteração de um tom vermelho do músculo para um tom pálido e amarelado como consequência da deterioração e/ou perda de qualidade. A ausência destas variações poderá estar associada ao manuseamento e às lavagens a que os filetes foram sujeitos, tal como foi anteriormente explicado.

Em relação ao  $\Delta L^*$  observou-se uma variação negativa para o grupo controlo C1r, que significa que as amostras após 6 meses de armazenamento em congelação estavam mais escuras que as amostras ao mês 0 (HunterLab, 2008). Os restantes grupos analisados, obtiveram um  $\Delta L^*$  positivo, o que significa que as amostras após 6 meses de armazenamento em congelação encontravam-se mais brilhantes que as amostras iniciais. Este facto foi mais marcado para as amostras do grupo de estudo FTR. No  $\Delta a^*$  observa-se variação negativa para todos os grupos analisados, com exceção do grupo de controlo C1. A variação negativa deste parâmetro indica que as amostras após os 6 meses de armazenamento estavam, tendencialmente, a perder os tons vermelhos para adquirir tons esverdeados, e a variação positiva deste parâmetro indica que as amostras após 6 meses de armazenamento estavam a adquirir um tom mais vermelho que as amostras iniciais. Em relação ao  $\Delta b^*$ , observa-se uma variação positiva que foi semelhante para todos os grupos. Segundo HunterLab (2008), um  $\Delta b^*$  positivo indica que as amostras após 6 meses de armazenamento estavam a adquirir um tom mais amarelado que as amostras no mês 0. Em relação ao valor de  $\Delta L^*$ , pressupõe-se que os resultados estejam relacionados com a perda de humidade por deterioração do músculo dos filetes, logo perda de brilho, visualizando este facto no grupo de controlo C1, o mais oxidado, e uma diferença mais positiva no grupo de estudo FTR, o menos oxidado.

O  $\Delta E^*$  revelou uma variação elevada da cor em todos os grupos, com exceção do grupo (FT) que apresentou  $\Delta E^*$  inferior a 2, o que de acordo com Francis e Clydesdale (1975), esta variação total de cor não seria detetável pelo consumidor. O facto do grupo de estudo FTR ter um valor de  $\Delta E^*$  elevado não está diretamente relacionado com o processo de deterioração que sofreu, pois tendo em consideração que foi este grupo que

atingiu valores menos elevados de TBARS, sugere que este valor esteja relacionado com o elevado valor de  $\Delta L^*$ .

### 5.3.3. *Análise Sensorial Hedónica*

Os consumidores denotaram uma preferência pela amostra representativa do grupo de estudo FTR, seguida da amostra representativa do grupo de estudo FT e depois da amostra representativa do grupo controlo C1. Esta ordem só não foi verificada aos dois meses, pois nesta ocasião foi escolhido em 2º lugar de preferência a amostra representativa do grupo controlo C1 e a amostra representativa do grupo de estudo FT, foi escolhida em 3º lugar. Nesta avaliação, aos dois meses, houve certas dúvidas/dificuldade em discriminar diferenças na avaliação dos filetes de sardinha, o que se demonstra pela proximidade de resultados. Esta proximidade de resultados, pode estar associado a um processo oxidativo não muito avançado que ainda não se refletiu visualmente nas características sensoriais do produto, o que faz com que as diferenças entre os filetes não sejam acentuadas. Por esta razão é provável que a escolha feita pelos consumidores foi feita pela avaliação de parâmetros como a forma do corte do filete, a quantidade de espinhas ou se existiam manchas que possam estar presentes no músculo do peixe. No quarto e sexto mês a escolha é mais clara, provavelmente pelo facto do processo oxidativo ser mais evidente na superfície dos filetes de peixe, sendo os escolhidos como preferidos pelos consumidores, os filetes de sardinha menos afetados pelo processo de deterioração/oxidação. Pela análise de correspondências em que se avalia a similitude nas atitudes dos consumidores, neste caso das preferências, há uma associação clara da escolha do 1º e 2º lugar com os grupos tratados com antioxidantes, (FTR e FT respetivamente). Assim, os antioxidantes utilizados na preparação dos filetes de sardinha, contribuíram para uma melhoria da qualidade sensorial e conseqüentemente para a estabilidade oxidativa no final do armazenamento em congelação.



# VI. Conclusão, Perspetivas Futuras



### Conclusão

O método por aspersão dos antioxidantes para adição destes aos filetes de sardinha, revelou-se uma técnica eficiente, rápida, controlável, rentável e com o mínimo de perdas possível. E com potencial para ser uma técnica automática.

As sardinhas utilizadas para elaborar filetes usados em ambas as experiências (armazenamento em refrigeração e armazenamento em congelação) são do mesmo mês (Junho) de anos consecutivos (2011 e 2012), mas com uma enorme diferença no próprio conteúdo lipídico (2,65 g/100g e 13,00 g/100g, respetivamente). O que pode ser consequência de vários fatores como estado sexual da espécie, sexo, reprodução, disponibilidade alimentar, temperatura da água, salinidade e profundidade do mar (Nunes e tal. 2008). O teor lipídico elevado, do lote utilizado para a experiência de armazenamento em refrigeração, fez com que este fosse mais suscetível a deterioração/processo oxidativo, que o lote utilizado na experiência de armazenamento em congelação. O que é comprovado pelos valores de TBARS iniciais encontrados em ambos os lotes. O lote de maior conteúdo em gordura está associado à formação de mais produtos secundários formados.

Pelo perfil dos ácidos gordos, podemos concluir que os filetes de sardinha são um produto que importa vários benefícios à saúde de quem os consome, pela sua elevada quantidade em ácidos gordos polinsaturados.

Em ambas as experiências (armazenamento em refrigeração e armazenamento em congelação) verificou-se inibição/retardamento sobre o processo oxidativo pela atividade dos antioxidantes adicionados. Apesar de estatisticamente não existirem diferenças entre os filetes tratados com tocoferóis na presença e na ausência de extrato de rosmaninho, pela observação, tendencial, dos resultados das análises e pelo teste hedónico de preferência dos consumidores, podemos concluir que o antioxidante de tocoferóis e extrato de rosmaninho exerceu um efeito mais positivo sob a estabilidade oxidativa dos filetes de sardinha, em relação ao antioxidante de tocoferóis. O que demonstra que o extrato de rosmaninho amplia a atividade antioxidante aos tocoferóis, pois embora a concentração de tocoferóis seja menor que o antioxidante de tocoferóis, este exerceu o mesmo efeito. Para além de tudo isto, este antioxidante de tocoferóis com extrato de rosmaninho é de baixo custo, pois para uma tonelada de filetes de sardinha apenas custaria 43,51€ em antioxidante.

Nas análises elaboradas, apenas não foi evidenciado o processo oxidativo na avaliação instrumental de cor, onde seriam esperadas diferenças visíveis, principalmente,

nos filetes de sardinha sem tratamento algum. Ocorreram algumas variações nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , mas não significativas.

Pela análise dos TBARS, os filetes de sardinha tratados com antioxidantes e armazenados em congelação nunca deixaram de ter boa qualidade durante os 6 meses de armazenamento. Os filetes de sardinha tratados com antioxidantes e armazenados em refrigeração tornaram-se impróprios para consumo humano após 24 horas. O que, certamente, está relacionado com a ausência de qualquer tipo de embalamento, sendo apenas conservado pela temperatura baixa. A reforçar esta ideia, outros autores verificaram que quando embalados a vácuo, os filetes de sardinha tratados com extrato de rosmaninho e armazenados em refrigeração, poderiam durar até 20 dias (Ozogul, *et al.* 2010, a).

O uso de antioxidantes naturais é uma solução pouco dispendiosa, que permite o aproveitamento total de produtos com menores desperdícios de produtos de pesca, com grande necessidade de escoamento, como um produto tão farto como a sardinha no mercado nacional. Em simultâneo, satisfaz as necessidades dos consumidores, disponibilizando estes produtos durante todo o ano, em boas condições de consumo. E ainda permite a elaboração de produtos pré-cozinhados, transformados e filetados.

### **Perspetivas futuras**

Para entender melhor o efeito dos antioxidantes sobre os filetes de sardinha e para fortificar as conclusões tiradas deste estudo, fará sentido efetuar um estudo microbiológico e uma avaliação na oxidação proteica, em especial, a oxidação da mioglobina.

Neste estudo e em outros anteriormente referidos, verificou-se inibição/retardamento sobre o processo oxidativo pela atividade dos antioxidantes adicionados. O antioxidante vitamina E com extrato de rosmaninho exerceu um efeito mais positivo sob a estabilidade oxidativa dos filetes de sardinha, em relação à adição apenas de tocoferóis. O que demonstra que o extrato de rosmaninho tem atividade antioxidante efetiva, potenciando o efeito obtido pelos tocoferóis. Como tal, seria interessante analisar o efeito antioxidante do extrato de rosmaninho em diferentes concentrações, usado isoladamente e acoplado a diferentes concentrações de tocoferóis. Por outro lado, também seria relevante, através de uma análise sensorial, avaliar a

aceitação de extrato de rosmaninho ao paladar dos filetes de sardinha, por parte dos consumidores.

Além de experimentar diferentes concentrações de antioxidantes adicionados aos filetes de sardinha, também será pertinente experimentar várias formas de embalagem, como embalagem a vácuo, atmosfera controlada ou atmosfera modificada.

Também seria interessante, no futuro, adicionar outras especiarias com atividade antioxidante, utilizando-as como um tempero completo (sem necessidade de outros condimentos) para os filetes de sardinha, entre outros produtos semelhantes, elaborando um produto pré-cozinhado, com apenas necessidade de tratamento térmico, e que se conserve por mais tempo a baixas temperaturas. O efeito de antioxidantes em outras espécies de peixe, tal como, a utilização de outras técnicas de conservação seria outras das variáveis a utilizar em estudos futuros.



## VII. Bibliografia

---

---



Andersen, M., Lauridsen, R., Skibsted, L. (2003). *Phytochemical Functional Foods: Optimising the use of phenolic compounds in foods* Johnson, I.T. (Editor). Woodhead Publishing, Limited, Cambridge, 315-346.

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis* (17<sup>th</sup> ed.), Gaithersburgh, Maryland: Association of Official Analytical Chemists.

Bandarra, N., Batista, I., Nunes, M., Empis, J. e Christie, W. (1997). *Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (Sardina pilchardus)*, Journal of Food Science, Vol. 62, No.1, 40-42.

Bandarra, N., Calhau, M., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M., Bártolo, H., Faria, M., Fonseca, M., Gonçalves, J., Batista, I. e Nunes, M. (2004). *Composição e valor nutricional dos produtos de pesca mais consumidos em Portugal*, Publicações avulsas do IPIMAR, Nº 11, 96-97.

Bexiga, S. (2005). *Governo toma posição face à captura da sardinha*, disponível em: [qualfood.biostrument.com](http://qualfood.biostrument.com).

Bligh, E. e Dyer, W (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*, Canadian Journal of Biochemical Physics, 37, 911-917.

Bombardelli, R., Syperreck, M. e Sanches, E. (2005). *Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado*, UNIPAR, Umuarama, v.8, n.2, p. 181-195.

Borderías, A.J., Sánchez-Alonso, I. e Pérez-Mateos, M. (2005). *New applications of fibres in foods: addition to fishery products*, Trends in Food Science and Technology, Nº16, pp. 458-465.

Candeias, V., Nunes, E., Morais, C., Cabral, M. e Silva, P. (2005). *Gorduras – Princípios para uma Alimentação Saudável*, Direcção Geral da Saúde.

Caponio, F., Lestingi, A., Summo, C., Bilancia, M. e Laudadio, V. (2004). *Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (Sardina pilchardusW.): influence of sex and length*, Journal of Applied Ichthyology, nº20, pp. 530–535.

Cardoso, C., Mendes, R., Vaz-Pires, P. e Nunes, M. (2010). *Effect of salt and MTGase on the production of high quality gels from farmed sea bass*, Journal of Food Engineering, Nº101, pp. 98-105.

Chaijana, M., Benjakul, S., Visessanguan, W. e Faustman, C. (2005). *Changes of pigments and color in sardine (Sardinella gibbosa) and mackerel (Rastrelliger kanagurta) muscle during iced storage*, nº 93, pp. 607-617.

Dias, Delphine (2012). *Benefícios gerais do consumo de peixe*, Fileira do Pescado.

Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S. e Cava, R. (2007). *Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté*, LWT, nº40, pp. 58-65.

FAO (2004-2012). *Fishery and Aquaculture Country profiles. Portugal*, FAO Fisheries and Aquaculture Department.

FAO (2001). *Quick Freezing of Fish*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Nº27.

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. e Suman, S. (2010). *Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control*, Meat Science, nº 86, pp. 86–94.

Francis, F. J.; Clydesdale, F. M. *Food Colorimetry: Theory and Applications*; AVI Publishing: Westport, CT, 1975.

Frankel, E. e Meyer, A. (2000). *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*, Journal of the Science of Food and Agriculture, nº 80, pp. 1925 -1941.

Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M. e Morcuende, D. (2010, b). *Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties*, J. Agricultural and Food Chemistry, nº58, pp. 8854-8861.

Ganhão, R., Estévez, M. e Morcuende, D. (2011). *Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials*, Food Chemistry, pp. 772-778.

Ganhão, R., Morcuende, D. e Estévez, M. (2010, a). *Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage*, Meat Science, pp. 402–409. Gomes, A. (2012). *Como desenvolver os nossos conhecimentos sobre os recursos oceânicos através da investigação científica e da tecnologia?*, Pescado controlado - Fileira do pescado.

---

---

García-Arias, M., Pontes, E., García-Linares, M., Garcia-Fernandez, M. e Sanchez-Muniz, F. (2003). *Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (Sardina pilchardus) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions*, Food Chemistry, nº83, pp. 349-356.

Gomes, A. (2012). *Como desenvolver os nossos conhecimentos sobre os recursos oceânicos através da investigação científica e da tecnologia?*, Pescado controlado - Fileira do pescado.

Gray, J. e Monahan, F. (1992). *Measurement of lipid oxidation in meat and meat products*, Trends Food Science and Technology, nº 12, pp. 315-319.

Hamilton, R., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. e Pierce, H. (1997). *Chemistry of free radicals in lipids*, Food Chemistry, nº60, pp. 193-199.

Heinonen, H. (2007). *Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics-a Finnish perspective*, Molecular Nutrition & Food Research, nº 51, pp. 684–691.

Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., and Storey, K. B., *Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation*, Free Radic. Biol. Med., nº19, pp. 271, 1995.

*HunterLab (2008). Insight on color – applications note, Hunter Associates Laboratory, Inc., Vol.8, nº7.*

Huss, H.H. (1997). *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*. FAO Documento Técnico sobre as Pescas. Nº 334.

INE (2012). *Estatísticas da Pesca 2011*, Instituto Nacional de Estatística, I.P, Portugal.

Koleva, I. (2007). *New methods for the screening of antioxidants in three Sideritis species*, Thesis wageningen University.

Lepage, G. e Roy, C. (1986). *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction*, The Journal of Lipid Research, nº 27, pp. 114–120.

Lidon, F. e Silvestre, M. (2007). *Indústrias Alimentares – aditivos e tecnologia*. Lisboa: Escolar Editora.

Maqsood , S. e Benjakul, S. (2009). *Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince*, Food Chemistry.

Martin, C., Almeida, V., Ruiz, M., Visentainer, J. E., Matshushita, M., Souza, N. Visentainer, J. (2006). *Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods*, Revista de Nutrição, 19(6):761-770.

Martins, I., Porto, A. e Oliveira, L. (2006). *Tabela da composição dos alimentos*, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde do Doutor Ricardo Jorge, 62-63.

Medeiros, S. (2012). *Tecnologia e inspeção de pescado e derivados – Deterioração do pescado*, Qualittas – Instituto de pós-graduação.

Mendes, R., Cardoso, C. e Pestana, C. (2009). *Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test*, Food Chemistry, vol, 112, pp. 1038–1045.

Monteiro, E. (2009). *A Pesca e a Sustentabilidade*, Pescado controlado - Fileira do pescado.

Moure, A., Cruz, J., Franco, D., Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H. Núñez, M. e Parajó, C. (2001). *Natural antioxidants from residual sources - Review*, Food Chemistry, nº 72, pp. 145-171.

Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel (2008). *Handbook of Muscle Foods Analysis*, CRC Press, pp. 51-77, 141-151, 221-235, 400-412, 467-474, 503-509.

Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel (2010). *Handbook of seafood and seafood products analysis*, CRC Press, pp. 69-120, 189-214, 309-326, 395-424.

NP 2032 (2009). *Produtos de pesca e da aquicultura. Determinação do teor de cinza total*, 1º ed., Instituto Português da Qualidade.

NP 3356 (2009). *Produtos de pesca e da aquicultura. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) – Método espectrofotométrico*, 1º ed., Instituto Português da Qualidade.

NP 4488 (2009). *Produtos da pesca e da aquicultura. Determinação do teor de azoto total e cálculo do teor de proteína bruta*, 1º ed., Instituto Português da Qualidade.

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

Osawa, C., Felício, P. e Gonçalves, L. (2005). *Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos*, Quim. Nova, Vol. 28, No. 4, 655-663.

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

Ordóñez, J., Rodriguez, M., Álvarez, L., Sanz, M., Minguillon, G., Perales, L. e Cortecero, M. (2005, a). *Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos*, Vol. 1., Porto Alegre: Artmed.

Ordóñez, J., Rodriguez, M., Álvarez, L., Sanz, M., Minguillon, G., Perales, L. e Cortecero, M. (2005, b). *Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal*, Vol. 2., Porto Alegre: Artmed.

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

Ozogul, Y., Durmus, M., Balıkcı, E., Ozogul, F., Ayas, D. e Yazgan, H. (2010, b). *The effects of the combination of freezing and the use of natural antioxidant technology on the quality of frozen sardine fillets (Sardinella aurita)*, International Journal of Food Science and Technology.

Passador, J., Filho, D., Spanhol, C., Rodrigues, F. e Sabes, J. (2006). *A percepção do consumidor de alimentos “fora de casa”: um estudo multicase na cidade de Campo Grande/MS*, XIII SIMPEP - Bauru, SP, Brasil.

Pikul, J., Leszczunski, D. e Kummerow, F. (1989). *Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, nº37, pp. 1309-1313.

Raharjo, S. e Sofos, J. (1993). *Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review*, Meat Science, nº35, pp.145-169.

Ramalho, V. e Jorge, N. (2006). *Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos*, Quim. Nova, Vol. 29, Nº. 4, pp. 755-760.

Selmi, S., Limam, Z., Batista, I., Bandarra, N. e Nunes, M. (2011) *Effects of storage temperature and  $\alpha$ -tocopherol on oil recovered from sardine mince*, International Journal of Refrigeration, n° 34, pp. 1315-1322.

Shahidi, F. e Wanasundara, U. (2002). *Methods for Measuring Oxidative - Rancidity in Fats and Oils*, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition, CRC Press, capítulo 14.

Simopoulos, A. (2000). *Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA: human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids*, Poultry science, v.79, p. 961-970.

Stratoudakis, Y. e Silva, A. (2001). *A pescaria da sardinha, uma prioridade da investigação*, IPIMAR, n°16.

Tokur, B., Korkmaz, K. e Ayas, D. (2006). *Comparison of Two Thiobarbituric Acid (TBA) Method for Monitoring Lipid Oxidation in Fish*, Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, n° 23, pp. 331–334.

Torpy, J.(2006). *Eating Fish: Health Benefits and Risks*, The Journal of the American Medical Association, Vol. 296, No. 15.

Uauy, R e Valenzuela, A. (2000). *Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids*, Nutrition, Tarrytown, v.16, n. 7/8, p.1-5.

Vyncke, W. (1975). Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). *Fette Seifen Anstrich*, 77, 239–240.

Wrolstad, R., Acree, T., Decker, E., Penner, M., Reid, D., Schwartz, S., Shoemaker, C., Smith, D. e Sporns, P. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*, John Wiley & Sons, Inc.

Yin, M. e Faustman, C. (1993). *The influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: a liposome model*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, n°41, pp. 853-857.

Zlatanov, S. e Laskaridis, K. (2007). *Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish – sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*)*, Food Chemistry 103, 725–728.