

# Revestimentos comestíveis com incorporação de extratos de macroalgas para aplicação em filetes de peixe sujeitos a fritura

Ana Rita Ventura Tavares

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadores: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves - Instituto Superior de Agronomia, Doutora Marta Neves - MARE – Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, Politécnico de Leiria.

## **Júri**

### **Presidente**

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

### **Vogais**

Doutora Marta Maria de Melo Lopes Neves, Investigadora Auxiliar do(a) Mare - Centro de Ciências do Mar e do Ambiente do Instituto Politécnico de Leiria;

Doutora Susana Filipa Jesus Silva, Professora Adjunta do(a) Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche do Instituto Politécnico de Leiria.

Lisboa, 2020

Esta dissertação respeita a ortografia atual do acordo ortográfico.

## Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

Ao orientador Professor Doutor Vítor Alves, por todo o apoio e paciência na realização deste trabalho, esclarecimento de dúvidas, simpatia, e cuidada revisão da dissertação. Também pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas críticas construtivas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho. E por todas as palavras de incentivo, mesmo quando as coisas não corriam bem.

À coorientadora Professora Doutora Marta Neves, pelo entusiasmo e conhecimento partilhado, paciência, simpatia, cuidada revisão da dissertação, assim como pela igual disponibilidade e orientações e que sem ela a celeridade e concretização dos resultados não seria possível.

À professora Doutora Teresa Mouga pela partilha de informação e disponibilidade.

Ao meu colega Manuel Carvalho pela predisposição e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e apoio ao longo deste trabalho.

À amiga e colega Mariana Lopes (Mia) pelo companheirismo, amizade ao longo de todo o trabalho experimental que sem ela o caminho seria tumultuoso.

À Diana, técnica do laboratório, pelo apoio e boa disposição durante a realização do trabalho prático.

À minha amiga Ana Filipa Alves (Pipa) pela amizade, companheirismo e pela presença incansável com que me apoiou ao longo deste período e por ser aquela irmã que nunca tive.

Ao meu namorado André Figueiredo por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda prestada durante a elaboração da presente dissertação, especialmente pelo alento.

À minha amiga Mónica Correia por ser a minha confidente e conselheira quando mais precisei.

Ao meu irmão João Tavares, Johnny Bravo, por mostrar ser um exemplo de resiliência na sua vida académica que me serviu de inspiração para continuar.

À minha tia Isabel agradeço o apoio e motivação incondicional, um “obrigada” será sempre pouco até porque foi das poucas pessoas que sempre acreditou que iria alcançar os meus objetivos académicos.

Aos meus pais, primas (Nunu, Madrinha e Bolota) e tios (Cunca e tia Lurdes) pelo seu apoio, incentivo, amizade, paciência demonstrados e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo, sem eles este trabalho não seria possível.

E por fim e não menos importante agradeço a Deus por ter-me amparado e dado força neste momento tão importante a nível pessoal e profissional e nunca me falhar ao longo da minha vida.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4,13.

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de revestimentos comestíveis com incorporação de extratos provenientes de macroalgas para aplicação em filetes de cavala, com a finalidade de criar uma barreira que minimizasse a troca de compostos lipídicos e/ou água entre o peixe e o óleo durante a fritura e também diminuísse a degradação térmica dos ácidos gordos polinsaturados abundantes na cavala.

Prepararam-se extratos aquosos de cinco macroalgas e fez-se a sua caracterização em termos de teor de hidratos de carbono, fenóis totais e atividade antioxidante. Dado que os extratos não formaram películas por si só, com base no conteúdo fenólico e na atividade antioxidante, selecionaram-se os extratos de *Codium tomentosum* (E<sub>1</sub>) e *Fucus spirulis* (E<sub>6</sub>) para incorporar em formulações com alginato e gelatina de peixe, para formar películas/revestimentos bioativos. Prepararam-se soluções filmogénicas à base alginato com e sem incorporação dos extratos (AlgE<sub>1</sub>; AlgE<sub>6</sub> e Alg) e de gelatina de peixe (GelE<sub>1</sub>; GelE<sub>6</sub> e Gel). As películas obtidas foram caracterizadas em termos de espessura, cor e atividade antioxidante. A seguir, submergiram-se filetes de cavala em cada uma das soluções filmogénicas e levaram-se a fritar. Finalmente comparou-se o teor lipídico, humidade e índice de TBA dos filetes fritos.

Os filetes revestidos com as películas à base gelatina de peixe foram os que apresentaram menores teores de lípidos (<10%) e menor humidade (<40%). Estes resultados sugerem que as películas Gel funcionaram como uma barreira à migração de lípidos do óleo para o peixe, mas promoveram a saída de água do peixe para o óleo. A adição dos extratos de macroalgas nas soluções filmogénicas não se traduziu no aumento da atividade antioxidante das películas nem na diminuição da oxidação lipídica do peixe revestido.

**Palavras-chave:** Macroalgas, revestimentos comestíveis, filetes de cavala, alginato, gelatina de peixe.

## Abstract

The present work had as objective the development of edible coatings with incorporation of extracts from macroalgae for application in mackerel fillets, with the purpose of creating a barrier that minimized the exchange of lipid compounds and / or water between the fish and the oil during frying and also reduce the thermal degradation of the polyunsaturated fatty acids abundant in mackerel.

Aqueous extracts of five macroalgae were prepared and characterized in terms of carbohydrate content, total phenols and antioxidant activity. Since the extracts did not form films on their own, based on the phenolic content and antioxidant activity, extracts of *Codium tomentosum* (E<sub>1</sub>) and *Fucus spirulis* (E<sub>6</sub>) were selected to incorporate in formulations with alginate and fish gelatin, to form films / bioactive coatings. Alginate-based filmogenic solutions were prepared with and without extracts (AlgE<sub>1</sub>; AlgE<sub>6</sub> and Alg) and fish gelatin (GelE<sub>1</sub>; GelE<sub>6</sub> and Gel). The films obtained were characterized in terms of thickness, color and antioxidant activity. Then, mackerel fillets were submerged in each of the film-forming solutions and made to fry. Finally, the lipid content, moisture and TBA index of the fried fillets were compared.

The fillets coated with fish gelatin-based films showed the lowest levels of lipids (<10%) and the lowest humidity (<40%). These results suggest that the Gel films acted as a barrier to the migration of lipids from the oil to the fish, but promoted the outflow of water from the fish to the oil. The addition of macroalgae extracts to the filmogenic solutions did not result in an increase in the antioxidant activity of the films or in a decrease in the lipid oxidation of the coated fish.

**Keywords:** Macroalgae, edible coatings, mackerel fillets, alginate, fish gelatin.

# Índice Geral

Agradecimentos .....	I
Resumo.....	III
Abstract .....	IV
Índice de Figuras .....	VII
Índice de Tabelas.....	IX
<b>1. Introdução e objetivos .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Enquadramento Teórico.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Análise/Descrição do setor do peixe.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Espécies mais consumidas e valorização do alimento .....	12
2.1.2. Sustentabilidade e economia circular (desperdícios da indústria alimentar).....	14
2.1.3. Benefícios do consumo de peixe.....	16
2.1.4. Características da espécie em estudo.....	16
<b>2.2. Processamento do Peixe .....</b>	<b>18</b>
2.2.1. Tipos de processamento do peixe a nível industrial .....	18
2.2.2. Desvantagens da fritura e compostos formados .....	18
<b>2.3. Revestimentos comestíveis .....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Definição.....	19
2.3.3. Funções e requisitos dos revestimentos comestíveis.....	19
2.3.4. Materiais usados na produção de revestimentos comestíveis .....	21
2.3.5. Aplicação de revestimentos comestíveis e antioxidantes em processos de fritura.....	26
<b>2.4. Macroalgas .....</b>	<b>27</b>
2.4.1. Grupos de macroalgas .....	28
2.4.2. Aplicações na área alimentar .....	29
2.4.2.1. Polissacáridos .....	29
2.4.2.2. Antioxidantes .....	31
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Procedimento de obtenção dos extratos das macroalgas.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Caracterização dos extratos de macroalgas .....</b>	<b>35</b>
3.2.1. Quantificação dos Compostos fenólicos – Método direto .....	35
3.2.2. Determinação dos Açúcares totais- Método de Dubois ou fenol sulfúrico.....	35
3.2.3. Determinação da Atividade antioxidante total .....	36
3.2.3.1. Pela captura do radical livre de DPPH .....	36
3.2.3.2. Pela redução do ferro- FRAP .....	38
3.2.3.3. Pela captura do radical livre de ABTS .....	38
3.2.4. Capacidade de formação de películas .....	39
<b>3.3. Preparação e caracterização de películas bioativas.....</b>	<b>39</b>

3.3.1. Preparação de películas utilizando diretamente os extratos macroalgas .....	40
3.3.2. Preparação de películas bioativas à base de alginato e gelatina de peixe.....	41
3.3.3. Determinação da atividade antioxidante das películas bioativas.....	42
3.3.1.1. Pela redução do ferro- FRAP .....	42
3.3.1.2. Pela captura do radical livre ABTS .....	42
3.3.2. Medição da cor.....	42
3.3.3. Procedimento da medição espessura.....	44
<b>3.4. Aplicação de revestimentos comestíveis a filetes de cavala sujeitos a fritura.....</b>	<b>44</b>
3.4.1. Preparação das amostras .....	44
3.4.2. Processo de Fritura .....	44
3.4.3. Caracterização dos filetes de cavala antes e após fritura .....	44
3.4.3.1. Determinação do teor de lípidos totais.....	45
3.4.3.2. Caracterização do perfil de ácidos gordos dos filetes de cavala.....	46
3.4.3.3. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) .....	47
3.4.3.4. Determinação do teor de humidade .....	49
<b>3.6. Análise Estatística .....</b>	<b>49</b>
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Caracterização dos extratos de macroalgas .....</b>	<b>51</b>
4.1.1. Quantificação dos Compostos fenólicos.....	51
4.1.2. Estudo do conteúdo de açúcares totais.....	52
4.1.3. Avaliação da atividade antioxidante .....	53
4.1.3.1. DPPH.....	53
4.1.3.2. FRAP.....	55
4.1.3.3. ABTS.....	56
<b>4.2. Preparação e caracterização de películas bioativas .....</b>	<b>57</b>
4.2.1. Preparação de películas utilizando diretamente os extratos macroalgas .....	57
4.2.2. Preparação de películas bioativas à base de alginato e gelatina de peixe.....	59
4.2.3. Estudo da atividade antioxidante.....	60
4.2.3.1. FRAP.....	60
4.2.3.2. ABTS.....	61
4.2.4. Cor.....	63
4.2.5. Espessura.....	64
<b>4.3. Caracterização dos filetes de cavala antes e após fritura.....</b>	<b>65</b>
4.3.1. Determinação do teor de lípidos totais .....	65
4.3.2. Caracterização do perfil de ácidos gordos dos filetes de peixe.....	66
4.3.3. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA).....	69
4.3.4. Determinação do teor de humidade.....	71
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>72</b>
<b>6. Perspetivas de trabalho Futuro .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>84</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Consumo de pescado na Europa (FAO, 2017).....	11
<b>Figura 2</b> – Produção de produtos de pescado congelados, secos e salgados e preparações e conservas (INE, 2018). .....	12
<b>Figura 3</b> - Quantidade ( $10^3$ ton) de captura por cerco de peixe (INE, 2018). .....	13
<b>Figura 4</b> - Classificação dos revestimentos comestíveis (Raghav, Agarwal, & Saini, 2016). .....	22
<b>Figura 5</b> - Estrutura química de unidades monoméricas do alginato e a representação esquemática do modelo de egg-box <b>(a)</b> Lado esquerdo: conformação de Haworth; lado direito: conformação chair <b>(b)</b> Gelificação de blocos de poli-L-guluronato (Parreidt, Müller , & Schmid, 2018).....	23
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática do modelo CIELAB (X- rite, 2007).....	43
<b>Figura 7</b> - Compostos fenólicos dos extratos aquosos de macroalgas, determinados pelo método direto, expressos em EAG (mg ácido gálico/mg de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	51
<b>Figura 8</b> - Concentração dos açúcares solúveis totais dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método fenol- sulfúrico, expressa em equivalentes de malto-dextrina (mg malto-dextrina/mg de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ...	53
<b>Figura 9</b> - Atividade antioxidante dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método de DPPH, expressa em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	54
<b>Figura 10</b> - Atividade antioxidante dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método de FRAP, expressa em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	55
<b>Figura 11</b> - Atividade antioxidante dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método de ABTS, expressa em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	57
<b>Figura 12</b> - Resultados após 48 horas na estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ) das formulações com 1% de extrato (equação 3).....	57
<b>Figura 13</b> - Resultados da extração a quente da <i>Codium tomentosum</i> (extrato 1 e 2) com uma concentração de extrato de 2%. .....	58
<b>Figura 14</b> - A amostra Y encontra-se no lado esquerdo, no meio está a amostra W e à direita a amostra Z. ....	58
<b>Figura 15</b> - Atividade antioxidante das películas com extratos de macroalgas, determinada pelo método de FRAP, expressa em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de película). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	60
<b>Figura 16</b> - Atividade antioxidante das películas de macroalgas, determinada pelo método de ABTS, expressa em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de película). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.....	62
<b>Figura 17</b> - Teor lipídico das amostras, determinado pelo método de Folch, expresso em percentagem. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	65

<b>Figura 18</b> - Índice médio de ácido tiobarbitúrico das amostras, determinado através do TBA expresso em mg de malonaldeído por Kg de amostra com os respectivos desvios padrão presentes nas amostras. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	70
<b>Figura 19</b> - Teor de humidade das amostras, determinado gravimetricamente (por diferenças) expresso em percentagem. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes. ....	72

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Descrição do material biológico por espécie, lote/ano, exemplar, origem e grupo. ....	33
<b>Tabela 2-</b> Identificação dos extratos de macroalgas .....	35
<b>Tabela 3-</b> Soluções filmogénicas a partir de extratos de Macroalgas da tabela 1. ....	40
<b>Tabela 4 –</b> Solução filmogénica a partir dos extratos da <b>Amostra 1 + 2</b> ficando com 2% extrato. ....	40
<b>Tabela 5-</b> A amostra <b>Y</b> representa a solução filmogénica com alginato, a <b>Z</b> a solução filmogénica do extrato 1 a 5% e a <b>W</b> a solução filmogénica do extrato 1 a 10%. ....	41
<b>Tabela 6 -</b> Abreviaturas/Siglas das formulações selecionadas.....	41
<b>Tabela 7 -</b> Aparência das películas obtidas nos ensaios finais do delineamento experimental.....	59
<b>Tabela 8-</b> Parâmetros medidos pelo colorímetro (CIELAB) – L*, a* e b* (médias).....	63
<b>Tabela 9 -</b> Parâmetros CIELCH - Croma C* e h°. ....	63
<b>Tabela 10 -</b> Espessuras das películas (mm).....	64
<b>Tabela 11 -</b> Quantidade média (ug/mg) com os respetivos desvios padrão/dp (+/-) dos ácidos gordos presentes em cada amostra, obtidos por Cromatografia Gasosa. ....	67
<b>Tabela 12 –</b> Quantidade (ug/mg) de ácidos gordos presentes em cada amostra, obtidos do cromatograma, a sombreado estão os maiores valores obtidos experimentalmente. ....	69

## 1. Introdução e objetivos

Este trabalho insere-se no âmbito de um projeto de parceria entre o Instituto Superior de Agronomia e o MARE – Centro de Ciências do mar e do ambiente, Politécnico de Leiria.

No contexto do conceito de economia circular, ou seja, modelo estratégico de crescimento e investimento assente na eficiência e valorização dos recursos e na minimização dos impactos ambientais (Carrola, 2016), escolheu-se dois recursos abundantes na costa portuguesa (macroalgas e peixe) para realizar o presente estudo.

Neste *case study* irar-se-á estudar o efeito da aplicação de um revestimento comestível, à base de alginato e antioxidantes de macroalgas, na manutenção do perfil lipídico de filetes de cavala durante o processo de fritura.

Este trabalho é composto por quatro etapas. A primeira consiste na obtenção de extratos de macroalgas marinhas, que posteriormente serão caracterizados em termos de fenóis totais, poder antioxidante e açúcares totais.

A segunda parte foca-se na formulação de um revestimento comestível com propriedades antioxidantes à base de alginato e de extratos de macroalgas. Proceder-se-á à caracterização destes revestimentos sob a forma de películas em termos de propriedades antioxidantes e cor.

Na terceira parte far-se-á a aplicação do revestimento, por imersão, em filetes de cavala, que posteriormente serão processados por fritura. Pretende-se avaliar se o revestimento funciona como barreira durante a fritura, de forma a minimizar a alteração das características nutricionais dos filetes em termos de lípidos totais, perfil de ácidos gordos, grau de peroxidação lipídica e teor de humidade.

## 2. Enquadramento Teórico

### 2.1. Análise/Descrição do setor do peixe

Portugal é um país com uma extensa costa, com mais de 900 quilómetros e uma zona económica exclusiva superior a 1,7 milhões de quilómetros quadrados (uma das maiores zonas do oceano Atlântico), o que fez com que desde sempre a pesca fosse uma arte tradicional (Acope - Associação dos comerciantes de pescado, 2016).

Segundo a FIPA (Federação das Indústrias Portuguesas Agroalimentares), em 2017 a indústria alimentar foi considerada o maior setor de produção na União Europeia em termos de volume de negócios, de valor acrescentado (1,7%) e de criação de emprego (4,24 milhões de pessoas, ou seja, 15%) (Deloitte, 2014).

De acordo com um artigo divulgado pela *New Economics Foundation* (NEF) e pela OCEAN2012, Portugal é um dos países da União Europeia (UE) mais dependente de pescado. O consumo nacional é superior ao que a frota portuguesa consegue pescar dentro da UE, o que torna o país dependente da importação de peixe de países não comunitários (FAO, 2017). Também é o que contém maior consumo de peixe por habitante na Europa e o terceiro a nível mundial. Sendo o consumo de peixe cerca de 55,6 kg/per capita/ano (figura 1) é mais do dobro do consumo médio na Europa (22,3 Kg/per capita/ano) (FAO, 2017).



Figura 1 – Consumo de pescado na Europa (FAO, 2017).

Na sequência da diminuição do consumo de carne devido ao impacto da agropecuária e tendências alimentares levou o consumidor a optar por alternativas, sobretudo de peixe. As fontes de proteína animais (como a carne, peixe e derivados) e soja, apresentam perfis de aminoácidos essenciais mais

próximos daqueles que necessitamos e uma maior digestibilidade, sendo, por isso, consideradas proteínas de elevado valor biológico (Sousa, 2018).

### 2.1.1. Espécies mais consumidas e valorização do alimento

Em relação à estrutura de produção (figura 2), nos produtos de pescado congelados, o tipo de pescado predominante é “outros” (não estão mencionados na figura) seguido do bacalhau. Nos produtos secos e salgados a maior percentagem é referente ao bacalhau salgado e seco. Por fim, nas preparações e conservas o género de pescado, é mais equilibrado face às outras estruturas de produção, sendo o atum, sardinha e “outros” os que detêm mais percentagem (INE, 2018).

As “conservas de cavala, cavalinha e sarda”, (com uma representatividade de 5,8%), figura 2, registaram também um aumento de produção da ordem dos 9,0%, competindo com o eventual aumento de preço unitário da conserva de sardinha (INE, 2018).

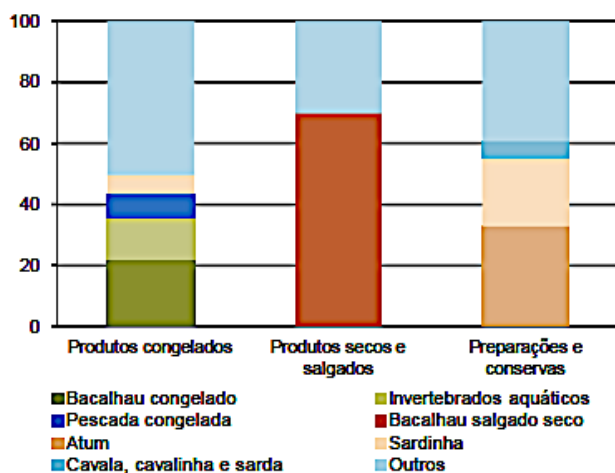


Figura 2 – Produção de produtos de pescado congelados, secos e salgados e preparações e conservas (INE, 2018).

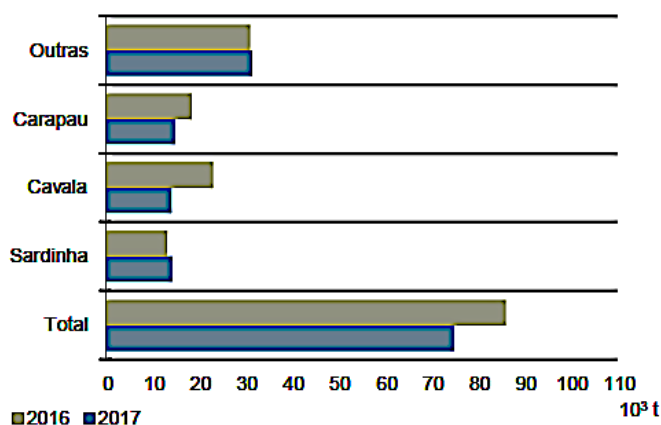
Em 2017 o total da quota pesqueira para Portugal aumentou 11%, nomeadamente com o lagostim, tamboril e biqueirão. Já a pescada a sofreu um corte de 5%.

No total, os pescadores portugueses vão poder pescar perto de 121 mil toneladas no próximo ano, mais 11% que em 2016. A quota de biqueirão sobe 18% face a 2016 (para as 6.522 toneladas), as capturas de tamboril aumentam em 54%, de raias em 10%, de carapau em 7% e de lagostim em 5%. O atum rabilho, espécie muito usada particularmente em sushi, viu as suas quotas aumentar em 20%, para as 399 toneladas, mantendo-se as capturas de patudo nas 4.515 toneladas, de espadarte nas 1.651 (Atlântico Norte e Sul) e de voador nas 2.813 (Atlântico Norte e Sul) (ALIF, 2018).

Em janeiro de 2019, apurou-se que o pescado sofreu um aumento do preço médio por quilograma, de 2,04€ em 2017 para 2,06€ em 2018, atingindo o valor mais elevado desde que existem registos estatísticos sistematizados. As espécies mais significativas em valor de vendas foram o polvo

(35,5 milhões de euros, mais 7,1% de aumento no preço médio por quilo), a sardinha (23,8 milhões de euros, mais 25,8%) e o carapau (14,7 milhões de euros, mais 23,2%). O aumento do valor de vendas de sardinha, e por consequência indireta do carapau, estará associado às restrições que a captura da primeira espécie tem tido nos últimos dois anos (Alvarez, 2019).

Na figura 3, identifica-se a pesca de cerco como o segmento mais representativo destas estruturas, mantendo-se a cavala, o carapau e a sardinha como as principais espécies em volume de pescado descarregado. Corresponderam, respetivamente, a 72,9% da cavala, 78,0% do carapau e 98,1% da sardinha descarregados em portos nacionais em 2017. O volume de descargas de pescado efetuado



**Figura 3** - Quantidade (  $10^3$  ton) de captura por cerco de peixe (INE, 2018).

registou um decréscimo de 13,0% face a 2016, reflexo da menor descarga de cavala (-38,7%), de carapau (-19,7%) e de verdelho (-10,7%). Contrariamente, as capturas de sardinha pelas OP aumentaram 7,9% (INE, 2018).

Na figura 4 está representada a quantidade (ton) de cavala capturada ao longo de 16 anos, estando demarcada a vermelho. Embora tenha decrescido a quantidade de captura precisamente em 2006, 2009, 2014 e 2016 ao longo dos anos a cavala tem sido uma espécie que tem vindo a ganhar

destaque refletindo-se no aumento de quantidade de captura. Dado que, em 2018 teve valores de captura superiores à sardinha e carapau (INE, 2018).

Anos	Principais							
	Total	Águas salobra e doce				Peixes marinhos		
		Total	Lampreia	Savel	Engula	Total	Carapau	Cavala
2002	148.246	79	13	16	36	129.193	14.189	5.613
2003	151.576	77	27	29	13	129.700	11.147	8.122
2004	152.532	70	20	35	11	133.632	12.971	14.290
2005	145.656	62	26	21	8	125.113	13.228	14.658
2006	141.683	59	26	18	12	124.110	14.342	13.259
2007	160.834	72	24	31	12	145.427	10.322	20.464
2008	170.050	79	24	40	9	148.308	9.250	23.411
2009	144.792	131	57	58	11	126.348	10.723	14.427
2010	166.304	74	37	19	15	145.693	11.652	22.570
2011	164.236	90	50	27	8	147.971	10.024	31.089
2012	151.343	90	46	34	5	133.582	14.893	37.113
2013	144.654	130	50	72	5	123.777	15.337	37.309
2014	119.890	154	79	66	6	100.073	14.920	29.543
2015	140.831	126	77	37	5	120.757	19.955	46.430
2016	124.264	156	75	69	5	103.860	20.014	27.991
2017	118.395	188	46	134	4	99.834	19.054	19.482
2018	128.438	169	60	96	6	107.996	15.944	33.564

**Figura 4** – Quantidade (delineado a vermelho) em toneladas de cavala capturada de 2002 a 2018 (INE | DGRM/MM, 2019).

De acordo com estudos estatísticos da ONU o nível de população mundial em 2050 será de 9,8 mil milhões e como tal é necessário investir em outras espécies menos exploradas e ricas nutricionalmente para poder atender às necessidades (Shepard, 2019). Sendo este um dos fundamentos na escolha da cavala como espécie de pescado a estudar neste trabalho.

### 2.1.2. Sustentabilidade e economia circular (desperdícios da indústria alimentar)

Face às atuais tendências de aumento populacional, crescimento da procura e conseqüente pressão nos recursos naturais têm-se vindo a salientar a necessidade de as sociedades modernas avançarem para um paradigma mais sustentável (Sousa, 2018).

Durante décadas a pesca foi insustentável, sem ter em ponderação a renovação natural das espécies, conduzindo a uma situação limite que ameaça os nossos hábitos alimentares e o maior ecossistema do planeta (Green World, 2019).

A “sobrepesca” tornou-se a segunda maior ameaça para nossos oceanos, depois das alterações climáticas, visto que 93% do stock de peixe do mediterrâneo e 31% dos stocks globais estão sobre explorados. A pesca ilegal, não declarada e não regulamentada poderá chegar aos 26 milhões de toneladas, isto é, mais de 30% da captura anual total no mundo. Em 2014, os países pertencentes à UE importaram cerca de 85% de pescado (World Wide Fund for Nature, 2019).

A seção das pescas marinhas em Portugal encara adversidades em termos de sustentabilidade, quer a nível do ecossistema e quanto a nível económico. A condição de algumas unidades populacionais de peixes comerciais (mais precisamente as unidades populacionais de pelágicos e demersais) originou quebras de produção. Outrossim, o risco de uma diminuição adicional das reservas devido ao aumento da pressão pesqueira, mas também devido às mudanças nas condições climáticas (EMFF, 2013).

Não obstante, a informação de onde é e de que modo o peixe que está no mercado foi capturado, é obrigatória e deverá constar na etiquetagem ou ser indicada ao consumidor. Uma maneira de controlar as pescas sustentáveis é através de certificações, nomeadamente pelo MSC – *Marine Stewardship Council* (MSC, 2019). Além da mudança nos hábitos alimentares, a exigência por parte dos clientes e consumidores do selo de pesca sustentável da organização *Marine Stewardship Council* seria uma mais valia (Fernandes M. , 2017).

A celeridade com que utiliza aos recursos naturais são insustentáveis, na medida em que se consome mais recursos do que o que planeta consegue gerar. A economia mundial tem sido edificada com base num modelo linear, que atualmente está sob ameaça por causa da disponibilidade limitada de recursos naturais. Um modelo de desenvolvimento sustentável que permite devolver os materiais ao ciclo produtivo através da sua reutilização, recuperação e reciclagem, assegurando assim maior eficiência na utilização e gestão de recursos são alguns dos princípios da economia circular (Comissão Europeia, 2015). Salientando as políticas de resíduos, a hierarquização da gestão de resíduos, a prevenção da produção de resíduos, o de ciclo de vida e um design eco (Lipor, 2019). Permutando o conceito de fim-de-vida da economia linear por novos fluxos circulares, a economia circular é observada como uma constituinte chave para promover a dissociação entre o crescimento económico e o aumento no consumo de recursos, ligação até aqui vista como inexorável (Economia, 2019).

O desperdício de alimentos representa no final da cadeia da indústria alimentar grandes custos e perdas de valor, em particular, o processamento de peixes e moluscos produz grandes quantidades de subprodutos, principalmente espinhas, peles, vísceras e cabeças que representam cerca de 50 a 70% do conteúdo do material original. E estes subprodutos podem ser transformados e criar valor para a empresa (de la Caba, et al., 2018).

As peles e as espinhas do peixe são constituídas particularmente por colagénio, sendo um dos subprodutos da indústria de transformação de pescado. Na indústria, o processo de transformação de peixe pode produzir cerca de 30% de resíduos e a sua não valorização cria desperdícios e poluição, além de que se perde uma fonte de obtenção de gelatina animal (López-Caballero, et al., 2009). A gelatina de peixe tem sido usada designadamente para a produção de películas biodegradáveis e/ou comestíveis para embalagens para alimentos (REFS), aproveitando assim subproduto do pescado introduzindo assim o conceito de economia circular.

### **2.1.3. Benefícios do consumo de peixe**

Atente-se que o aumento da consciencialização do consumidor, relativamente à importância do ómega-3 e outros nutrientes para a saúde humana contribuiu para o aumento significativo do consumo de peixe (Os produtos do mar, 2018). Sendo este um dos principais fatores que impulsionou o crescimento do consumo de peixe no Mundo (Pesca, 2019).

Não obstante, o menor teor de gordura do peixe em relação à carne, facilita a digestibilidade promovendo um “esvaziamento” gástrico mais rápido que, por sua vez, leva à diminuição da sensação de saciedade (Real, et al., 2016).

O pescado é rico em proteínas de alto valor biológico, gerando uma indispensável fonte de aminoácidos essenciais, como a lisina e a isoleucina (Real, et al., 2016). Identicamente contém quantidades razoáveis de aminoácidos que coadjuvam na criação de defesas naturais do organismo contra algumas doenças relacionadas com o crescimento e desenvolvimento (Associação dos comerciantes de pescado, 2019).

Os benefícios do seu consumo são intervir e provocar uma redução dos níveis totais de LDL (o colesterol transportado pelas lipoproteínas de baixa densidade) no aumento dos níveis de HDL, com um efeito protetor para a sua saúde cardiovascular (Msd, 2018). São denominados de ácidos gordos essenciais, uma vez que o nosso organismo carece dos mesmos para um correto funcionamento, contudo não consegue produzi-los, sendo crucial obtê-los então através da alimentação (Ferreira, Ómegas 3 e 6, 2017).

O pescado é rico em minerais (cálcio, fósforo, ferro, flúor e sal), que permitem o funcionamento eficiente dos órgãos e músculos. Uma porção de peixe de 125 g possui entre 28 e 50% de cálcio, 24 a 44% de fósforo e 7 a 44% de ferro que o organismo requer diariamente (Ferreira, Ómegas 3 e 6, 2017).

### **2.1.4. Características da espécie em estudo**

A espécie animal em análise neste trabalho pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Scombridae, género *Scomber* e espécie *Scomber colias* (Gmelin, 1789), tendo como nome corrente Cavala (Fisheries and Aquaculture Department, 2019).

Precedentemente a cavala denominava-se de *Scomber japonicus*, contudo, averiguou-se que as populações de cavala do Oceano Atlântico são diferentes das do Oceano Pacífico, daí a distinção na designação da espécie (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2016).

Esta espécie fisicamente tem um corpo alongado e fusiforme, cabeça cônica, ligeiramente comprimida lateralmente, focinho pontiagudo e boca grande. As barbatanas são parcialmente desenvolvidas. A coloração altera-se desde o dorso, entre tonalidades azuladas e esverdeadas e o ventre

é prateado. Conseguem alcançar até 64 cm de comprimento, sendo o mais habitual os 30 cm (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2016).

Os aspetos relevantes fisionómicos que caracterizam são, a existência de 8-10 raios espinhosos na primeira barbatana dorsal, de duas cristas de cada lado do pedúnculo caudal, o dorso cinzento-azulado com listas em forma de “V” e abaixo das quais existem numerosas e pequenas manchas escuras, sendo translúcida a zona da cabeça situada entre os olhos. Estas duas últimas peculiaridades são as que mais facilmente permitem distinguir a Cavala da Sarda (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2016).

A taxa de crescimento desta espécie está relacionada com a alimentação e a temperatura do meio, tendo oscilações no tempo e entre diferentes locais. A cavala é um peixe ovíparo, com sexos separados, que se reproduz várias vezes ao longo da sua vida (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2016). A época reprodutiva decorre entre os meses de fevereiro e abril e subsistem normalmente em cardumes, encontrando-se perto da superfície (Scomber colias Gmelin, 1789 Atlantic chub mackerel, 2019).

Esta espécie pelágica é frequentemente encontrada em águas temperadas, sobre a plataforma continental, tendo como preferência profundidades entre os 0 e os 300 metros, distribuindo-se pelo Oceano Atlântico. Em Portugal, distribui-se por toda a costa continental, bem como nas águas costeiras dos arquipélagos dos Açores e Madeira (Marques, Zwolinski, Martins, & Skagen, 2013).

### **Composição nutricional**

Em termos nutricionais é um peixe com alto teor de proteína, ómega-3 e vitamina B<sub>12</sub> e fornece uma quantidade significativa das vitaminas do complexo B (hidrossolúveis: piridoxina- B<sub>6</sub>, riboflavina-B<sub>2</sub> e niacina- B<sub>3</sub>) e lipossolúveis tais como, A, K e E (Hernandez, 2005). E ainda sais minerais como o potássio, fósforo, cálcio, sódio, ferro, magnésio e zinco (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2016).

O ómega-3 é uma gordura polinsaturada que efetua ações de resposta inflamatória no nosso organismo também estimulam o bom funcionamento cerebral, e têm um papel fulcral nos processos de crescimento, desenvolvimento e reparação do organismo (Ferreira, Ómegas 3 e 6, 2017). Existem três tipos de ácidos gordos da série ómega-3, o ácido alfa linolénico (ALA – C18:3,  $\omega$ -3), o ácido eicosapentaenoico (EPA – C20:5,  $\omega$ -3) e ainda o ácido docosahexaenóico (DHA – C22:6,  $\omega$ -3). A proporção de ómega-3: ómega-6 deve privilegiar é de um rácio de 3:1. O ALA está naturalmente contido em alimentos de origem vegetal aquando o EPA e DHA está no pescado e óleos de peixe. Sempre que ingerimos ácidos gordos na forma de ALA este vai sofrer processos enzimáticos que o vão converter em EPA e DHA, mas esta alteração ocorre a 100% logo devemos preferencialmente incluir fontes que já contenham EPA e DHA e não apenas fontes de ALA (Saúde, 2019).

## 2.2. Processamento do Peixe

### 2.2.1. Tipos de processamento do peixe a nível industrial

Ter uma alimentação saudável depende não só da qualidade nutricional dos alimentos, mas também da forma como é processado. A eventual necessidade de adição de gordura e sal, a perda de vitaminas no contacto prolongado com a água ou a exposição a temperaturas muito elevadas são condições a considerar na altura de confeccionar os alimentos, de modo a permitir a conservação de nutrientes e a não adição ou formação de elementos pouco saudáveis para a saúde (Ferreira, Confeções Saudáveis, 2019). O pescado pode ser comercializado em fresco ou processado industrialmente. O processamento industrial mais frequente inicia-se pelo armazenamento do pescado seguindo-se a receção, corte/evisceração, vidragem, embalagem, pesagem e etiquetagem, acondicionamento, deteção de metais, armazenamento na camara de expedição (Minozzo, 2011). A eliminação das vísceras tem como objetivo a remoção das bactérias e enzimas estomacais responsáveis pelas reações de degradação do peixe e pela alta perecibilidade da carne. Para além do congelamento, as técnicas de conservação envolvem sobretudo a secagem e salga, defumação, fermentação e apertizados.

### 2.2.2. Desvantagens da fritura e compostos formados

Um alimento frito terá inevitavelmente mais gordura, contribuindo para o aumento do seu valor calórico, que um alimento confeccionado de outro modo. Na confeção dos alimentos pelo processo de fritura, as temperaturas elevadas em conjunto com a presença de água e oxigénio contidos nos alimentos dão origem a reações de oxidação do óleo, entre outras, que provocam alterações nas características do óleo especialmente ao nível do sabor, cheiro e tonalidade (ASAE, 2017).

Segundo Amorim et al. (2018), nos processos de fritura, a degradação dos óleos pode originar substâncias tóxicas de diversos tipos que podem ter efeitos bastante nocivos para a saúde. Todavia é essencial ter presente que a formação destes compostos está correlacionada com o tipo de óleo, temperatura a que são submetidos os alimentos, podendo ser diminuída com uma utilização adequada dos óleos de fritura (temperatura, número de utilizações, tempo da fritura) e também pela presença de antioxidantes. Os óleos vegetais têm usualmente antioxidantes da “família” do tocoferol, sendo alguns muito eficientes na proteção dos óleos contra as reações de oxidação.

Na fase inicial da fritura ocorre uma desidratação parcial dos alimentos, em que a água da sua composição e os materiais nela solubilizados migram. Já numa segunda fase, o óleo vai entrar nos alimentos, ocupando parte do espaço deixado livre pela água (por transferência de massa), o que depende fundamentalmente da temperatura do óleo e do alimento (Amorim et al., 2018).

Em contrapartida, a fritura dos de géneros alimentícios pode levar à formação de substâncias tóxicas, como a acrilamida, designados por contaminantes resultantes do processamento alimentar (ASAE, 2017). A acrilamida é uma substância que se forma de modo natural nos alimentos ricos em açúcares redutores (frutose e glucose) e um aminoácido, a asparagina (contido nas batatas), quando submetida a altas temperaturas, como se sucede nos fritos, grelhados e assados. Foi classificada como um agente potencialmente cancerígeno pela Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (Amorim et al., 2018).

A deterioração dos óleos, que ocorre durante a fritura é consequência de um conjunto de reações químicas de degradação, sobretudo de hidrólise (reação do óleo com a água onde gera diglicéridos, de ácidos gordos livres), oxidação (reação do oxigénio com o óleo onde origina álcoois e ácidos entre compostos) e polimerização (reações que sucedem-se nos óleos a temperaturas elevadas com formação de moléculas de grandes dimensões - polímeros) (ASAE, 2017).

Como resultado, estes compostos desempenham um papel significativo na saúde implicando distúrbios gastrointestinais, doenças imunológicas, doenças cancerígenas, diabetes, hipertensão e fetos prematuros (Homayouni et al., 2018).

## 2.3. Revestimentos comestíveis

### 2.3.1. Definição

Os revestimentos e películas comestíveis têm recebido especial atenção por causa de suas vantagens em comparação com películas sintéticas (Bourtoom, 2008). Estes são designados como uma camada fina de material que é comestível, com uma espessura inferior a 0,3 mm, que pode encontrar-se na superfície ou em camadas finas entre diferentes componentes do alimento (Huber et al., 2009). Este atua como uma barreira semipermeável, com o intuito de prolongar a vida útil do género alimentício, diminuindo a migração de água e solutos, trocas gasosas, microrganismos (fonte externa), processos oxidativos, taxa respiratória e alterações fisiológicas. Podem ser produzidos à base de compostos hidrofóbicos, por exemplo, à base de lípidos, ou hidrofílicos, como os hidrocolóides, por exemplo à base de polissacáridos, de proteínas ou ambos. Os revestimentos comestíveis não são produzidos quimicamente e são naturais. Os hidrocolóides são provenientes de animais, vegetais, algas ou microrganismos ( Raghav et al., 2016).

### 2.3.3. Funções e requisitos dos revestimentos comestíveis

As propriedades dos revestimentos comestíveis são baseadas na sua estrutura molecular, dimensão molecular e composição química (Raghav et al. , 2016). Tendo como finalidade criar uma barreira com funcionalidades dependendo das características dos alimentos, designadamente a redução da perda de

água por evaporação, o atraso da senescência natural de frutos, alteração das trocas gasosas (oxigênio e dióxido de carbono) e reduzir processos de oxidação (Huber et al., 2009).

Um dos maiores benefícios da utilização de revestimentos comestíveis é a possibilidade de conter múltiplos compostos ativos (antioxidantes e vitaminas) que podem ser incorporados à matriz polimérica e consumidos com os alimentos, acrescentando atributos nutricionais e sensoriais assim como proteção (Dhall, 2013). É comumente usado para uma melhorar a aparência (cor, estrutura) e preservação de hortofrutícolas. Os principais prós da sua utilidade são a sua comestibilidade, natureza não-tóxica e custo-benefício comparativamente a outros revestimentos sintéticos (Raghav et al., 2016). A principal razão por detrás do amplo uso de hidrocolóides nos alimentos é a sua capacidade de modificar a reologia de um produto alimentar. Isso inclui propriedades básicas sobretudo, o *flavour*, comportamento do fluído (viscosidade) e propriedades sólidas mecânicas (textura) (Saha & Bhattacharya, 2010).

Segundo Pavlath e Orts (2009) e Vargas *et al.* (2008) o revestimento ou filme comestível deve cumprir os seguintes requisitos (Vargas et al., 2008):

- Não conter componentes tóxicos, alergénios ou não-digestíveis;
- Fornecer estabilidade estrutural e evitar danos mecânicos provocados durante o transporte, manuseamento e comercialização;
- Ter uma boa adesividade à superfície dos alimentos, fornecendo uma cobertura uniforme;
- Controlar a migração de água tanto para o interior como para o exterior dos alimentos, mantendo o conteúdo de hidratação desejado;
- Ser semipermeável, mantendo o equilíbrio interno dos gases envolvidos na respiração aeróbia e anaeróbia, possibilitando, deste modo, atrasar a senescência;
- Evitar a perda de componentes do aroma, *flavour*, características nutricionais ou organolépticas, necessários para a recetividade do consumidor;
- Proporcionar estabilidade bioquímica e microbiana, enquanto fornece proteção contra a contaminação, infestações de pragas, proliferação de micróbios e outros tipos de decaimento;
- Manter ou melhorar o aspeto e os atributos sensoriais do produto;
- Servir como veículo a aditivos desejáveis como aromas, corantes, nutrientes e vitaminas. A incorporação de agentes antioxidantes e antimicrobianos fica limitada à superfície, minimizando assim o custo e sabores intrusivos;
- Serem facilmente produzidos e economicamente viáveis;
- Devem apresentar propriedades sensoriais adequadas ao alimento a revestir, serem transparentes e não apresentarem qualquer sabor nem odor;
- As suas formulações devem conter substâncias seguras, *food-grade* e de baixo custo;

– A sua tecnologia de produção não deve ser cara;

É de salientar, em adição às funções apresentadas, a função de barreira a óleos e gorduras por parte de revestimentos hidrofílicos. Deste modo, a aplicação deste tipo de revestimentos em filetes de peixe antes da fritura tem potencial para diminuir a absorção da mesma durante o processo.

#### **2.3.4. Materiais usados na produção de revestimentos comestíveis**

Os materiais usados em revestimentos comestíveis podem ser divididos em três categorias, sendo estas os hidrocolóides, lípidos e compósitos (Figura 4). Os materiais compósitos são materiais que possuem pelo menos dois componentes ou duas fases com propriedades físicas e químicas nitidamente distintas, formados pela junção de outros materiais com o propósito de ter um produto de qualidade superior, por exemplo, proteína/proteína, polissacáridos/proteína, lípidos/polissacáridos (Baldwin, Nisperos, Chen, & Hagenmaier, 1996).

Os hidrocolóides são divididos em dois grupos (subcategorias): polissacáridos e proteínas (figura 4) (Embuscado & Huber, 2009). Estes são amplamente empregues em inúmeros produtos alimentares e bebidas e verificou-se que os hidrocolóides executam um papel adicional apto a impedir a absorção excessiva de óleo durante o processo de fritura. Os revestimentos destes materiais também têm propriedades de barreira a gases e características mecânicas satisfatórias. Como estes polímeros são altamente hidrofílicos apresentam uma elevada permeabilidade à humidade, enquanto como barreiras a gases são mais eficazes e protegem contra a oxidação lipídica. Assim, uma variedade de alimentos foi testada após sua modificação superficial por revestimentos de hidrocolóides para evitar a perda de humidade, prolongar sua vida útil e também reduzir a retenção de óleo durante a fritura (Porta, et al., 2012).

##### - Revestimentos à base de polissacáridos

Os revestimentos à base de polissacáridos são dos mais utilizados para frutos, encontrando-se presentes na maioria das formulações disponíveis comercialmente. Estes polímeros oferecem boas propriedades de barreira aos gases, mas a sua alta hidrofiliidade faz com que tenham elevada permeabilidade ao vapor de água, o que os torna inadequados para a utilização em produtos imersos em soluções ou em ambientes com elevada humidade relativa (Vargas, Pastor, Chiralt, McClements , & González-Martínez , 2008).

Presentemente, existe uma grande diversidade de polissacáridos que são utilizados na produção de filmes comestíveis, com distintas características de peso molecular, grau de ramificação, conformação, carga elétrica e hidrofobicidade (Vargas, Pastor, Chiralt, McClements , & González-Martínez , 2008).

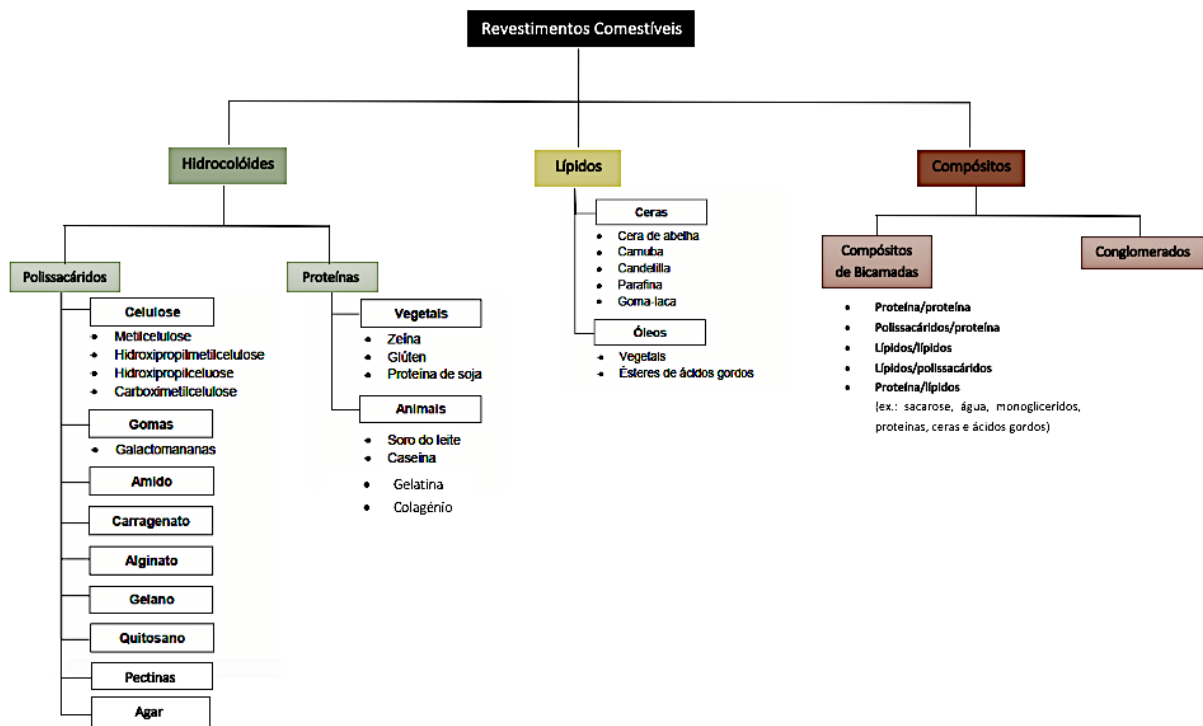
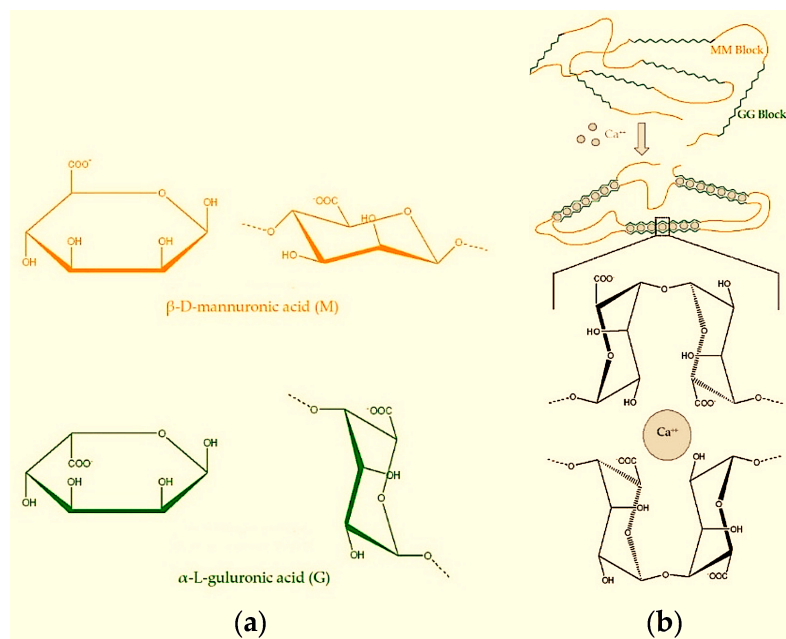


Figura 4- Classificação dos revestimentos comestíveis (Raghav, Agarwal, & Saini, 2016).

Diferenças nas suas características moleculares traduzem-se em diferenças na tendência para formar películas e no desempenho das mesmas. Os polissacáridos mais utilizados na produção de filmes e revestimentos comestíveis são sobretudo: amido e derivados, derivados da celulose, alginatos, carragenato, galactomananas, polissacáridos microbianos (e.g. gelano), quitosano e pectinas (Lin & Zhao, 2007).

### Alginato

O alginato ( $C_6H_8O_6$ ) é um polissacárido indigesto, geralmente produzidos a partir de vários géneros de algas castanhas da família *Pheophyceae* (nomeadamente, *Laminaria hyperborean*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*; em menor extensão *Laminaria digitate*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negrescens*, *Sargassum* sp.) A estrutura química dos alginatos é formada por copolímeros binários lineares, não ramificados, de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) ligados por 1-4 ligações glicosídicas, figura 5. Algumas bactérias também sintetizam alginato em forma de polímeros como exopolissacárido (substâncias poliméricas extracelulares - EP's). A estrutura do alginato proveniente de macroalgas castanhas pode ser separada em três frações (três blocos de ácido urónico): são regiões homopoliméricas dos blocos M e G e blocos MG alternados contendo ambos os ácidos poliurónicos. Os alginatos de origem bacteriana têm grupos O-acetil e têm maiores pesos moleculares em comparação com os polímeros de algas (Parreidt, Müller, & Schmid, 2018). O alginato pode ser encontrada na forma de extrato branco, amarelo e fibroso (Pavlath & Orts, 2009).



**Figura 5-** Estrutura química de unidades monoméricas do alginato e a representação esquemática do modelo de *egg-box* **(a)** Lado esquerdo: conformação de *Haworth*; lado direito: conformação *chair* **(b)** Gelificação de blocos de poli-L-guluronato (Parreidt, Müller, & Schmid, 2018).

Em 1881 o ácido algínico foi divulgado e isolado, alginato de sódio (E401), alginato de potássio (E402), alginato de amônio (E403) e alginato de cálcio (E404) são sais monovalentes de ácido algínico (E400). O ácido algínico e o alginato de cálcio são insolúveis na água, enquanto o alginato de sódio, o alginato de potássio e o alginato de amoníaco são polímeros solúveis em água (Parreidt, Müller, & Schmid, 2018).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) o alginato de sódio tem uma designação como substância GRAS (geralmente considerada segura) onde o uso é como agente emulsificante, estabilizador, espessante e gelificante. A Comissão Europeia listou o ácido algínico e seus sais (E400-E404) como um aditivo alimentar autorizado (Parreidt, Müller, & Schmid, 2018).

O alginato é muito utilizado em múltiplas indústrias, principalmente na indústria alimentar de bebidas, têxtil e farmacologia como agente espessante, estabilizador, emulsificante, agente quelante, encapsulamento, agente de suspensão ou usado para formar géis, filmes e membranas.

Os catiões bivalentes como o Ca são usados como agentes gelificantes do alginato, permitindo obter películas e revestimentos com maior resistência mecânica e à humidade.

A incorporação de alginato como película para fins alimentares tem sido recorrente, devido à sua capacidade de estabelecer ligações com o íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Com o objetivo de entender completamente o efeito das ligações de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e a relação ácido manurônico (M) e gulurônico (G) (M/G) da estrutura do alginato nas propriedades dos filmes (Costa, *et al.*, 2018).

O alginato é poliurônico, isto é, permuta iões facilmente. Na ausência de iões bivalentes, o alginato pode ser utilizado apenas para aumentar a viscosidade.

O método de gelificação do alginato é um processo complexo, dependendo da proporção e comprimento do bloco de ácido gulurônico (blocos G) na cadeia polimérica, capacidade de ligar os iões bivalentes, o tipo de iões gelificantes e as condições de gelificação afetam fortemente as propriedades do hidrogel do alginato. A introdução de catiões bivalentes (geralmente iões  $\text{Ca}^{2+}$ ) no sistema induz alterações conformacionais no alginato, como o alinhamento dos blocos G e a formação do modelo *egg-box* devido à ligação de iões cálcio entre duas cadeias. Uma maior quantidade de *G-Blocks* produzirá géis rígidos e densos, enquanto uma quantidade maior de *M-Blocks* gerará géis flexíveis e porosos. Posto isto, a resistência difusa dos géis que contêm predominantemente alto teor de alginato poligulurônico, versus compostos de alto peso molecular, é elevada. Além disso, os filmes contendo maiores proporções de *G-Block* (ou seja, menor relação M/G) apresentam melhor barreira à humidade (Parreidt, Müller, & Schmid, 2018).

#### - Revestimentos à base de proteínas

As proteínas podem apresentar distintas características moleculares, dependendo da sua origem biológica e função. Geralmente, estes polímeros possuem a capacidade de formar filmes devido à aptidão das suas cadeias laterais para formar ligações intermoleculares cruzadas. As propriedades dos filmes formados dependem, então, da natureza destas interligações. Em geral, considera-se que os filmes de materiais proteicos têm boas propriedades de barreira aos gases e ótimas características de estabilidade mecânica. A principal desvantagem é o facto das suas propriedades de barreira à água serem geralmente débeis. As proteínas mais comuns em revestimentos para hortofrutícolas são a zeína, o glúten, a proteína de soja e a proteína do soro de leite (Gennadios, Brandenburg, Park, Weller, & Testin, 1994).

#### **Gelatina de peixe**

A gelatina solúvel, adquirida industrialmente é obtida a partir de colagénio presente em ossos ou peles, é amplamente utilizada como um aditivo para melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade dos produtos alimentares. Mais precisamente, como um agente gelificante, emulsionante e espessante (Shyu, Chen, Chiang, & Sung, 2019).

Também pode ser empregue na produção de filmes ou revestimentos, para proteger contra a desidratação, a fotooxidação e trocas gasosas. A qualidade deste composto de grau alimentar depende em grande parte de suas propriedades reológicas (viscoelasticidade do gel, p.e.), mas também é determinada por outras características, sobretudo, ausência de cor, sabor e fácil dissolução. Devido a estas propriedades, a gelatina tem sido um dos materiais utilizados como matriz para componentes bioativos, e tem interesse devido à sua abundância, preço e excelentes propriedades funcionais.

Ultimamente, tem-se explorado a capacidade filmogénica e aplicabilidade como embalagem de alimentos (Gomez-Guillen, Ihl, Bifani, Silva, & Montero, 2006).

Existem várias razões para considerar a gelatina proveniente do pescado como uma alternativa à gelatina de mamíferos terrestres (bovinos e suínos); devido a doenças infecciosas e o impacto destes mamíferos na agropecuária. Apesar de algumas gelatinas de origem marinha apresentarem propriedades reológicas inferiores, estas podem ser utilizadas designadamente, em filmes e revestimentos e a sua fonte (subprodutos do processamento do pescado) confere-lhe valor no âmbito do conceito da economia circular (Gomez-Guillen, Ihl, Bifani, Silva, & Montero, 2006).

Neste trabalho, foram desenvolvidos revestimentos comestíveis para conservação do ómega-3 e outros compostos de valor nutricional na cavala durante a fritura. Os revestimentos elaborados e estudados têm por base hidrocolóides, um de origem polissacarídea - alginato e outro proteica (proveniência animal) - gelatina de peixe.

#### - Revestimentos à base de lípidos

Os revestimentos lipídicos são constituídos por substâncias hidrofóbicas (como os lípidos) desenvolvidos especificamente para limitar as migrações de água nos alimentos. Substâncias hidrofóbicas são barreiras eficazes contra a migração de água devido à sua natureza apolar (Huber & Embuscado, Lipid-Based Edible Films and Coatings). Estes revestimentos são também utilizados quando se pretende que uma superfície seja brilhante. Geralmente, estas substâncias são óleos, margarinas, ceras, resinas naturais, óleos essenciais, emulsionantes ou agentes ativos de superfície. Os principais aspetos negativos, são, conferir uma superfície oleosa ou dura e propriedades organolépticas indesejáveis, como um sabor ceroso ou rançoso. Alguns destes revestimentos (como ceras e goma-laca) podem restringir as trocas de gases entre a atmosfera e o alimento a um ponto em que os níveis de oxigénio internos se tornam demasiado baixos para suportar a respiração aeróbia - resultando em altos níveis internos de etanol, acetaldeído e dióxido de carbono. Este fenómeno pode provocar uma acumulação de *flavours* indesejáveis no alimento. Outro aspeto negativo que podem apresentar, é a sua instabilidade a alterações de temperatura, formando uma camada branca cerosa na superfície do alimento (Lin & Zhao, 2007).

#### - Revestimentos à base de compósitos

Os filmes e revestimentos compósitos podem ser produzidos a partir de bicamadas ou de emulsões estáveis. No caso dos revestimentos compósitos de bicamadas, geralmente são utilizados lípidos como camada adicional sobre uma camada de polissacárido ou proteína. No caso das emulsões, os lípidos são dispersos e retidos na matriz polimérica de proteínas e polissacáridos.

O carácter anfílico (características hidrofóbicas e hidrofílicas) das proteínas permite que estas estabilizem as emulsões de lípido-solução proteica através do equilíbrio entre as forças electrostáticas e hidrofóbicas, enquanto que os polissacáridos estabilizam as emulsões por aumentarem a viscosidade da fase contínua, e formarem uma camada polimérica ou uma rede que sustenta as gotas de lípido evitando a sua coalescência. Estes materiais compósitos têm sido investigados nas últimas décadas como componente-base de revestimentos comestíveis para frutas e vegetais (Vargas, Pastor, Chiralt, McClements , & González-Martínez , 2008).

### **Plastificantes**

As propriedades mecânicas das embalagens de biopolímeros podem ser melhoradas pela adição de plastificantes, que usualmente são não voláteis e miscíveis com o polímero. Os fins principais dos plastificantes são aumentar o volume livre ou a mobilidade molecular dos polímeros, diminuir as forças intermoleculares, conceder flexibilidade, reduzir o efeito quebradiço, melhorar a resistência ao impacto, corte e regular o fluxo do material de revestimento. Além disso, os plastificantes devem ter as mesmas propriedades de solubilidade do polímero no sistema solvente (para impedir a separação do plastificante ou do polímero durante a aplicação do filme / revestimento), possuir um alto ponto de ebulição e devem poder alterar as propriedades físicas e mecânicas do substância quando incorporada na formulação (Parreidt, Müller , & Schmid, 2018).

Em diversos estudos, o glicerol tem sido usado como plastificante, designadamente para películas e revestimentos de alginato. No entanto, a quantidade utilizada é variável. A WVR (resistência ao vapor de água) dos revestimentos de alginato aumenta com uma concentração crescente de glicerol até 1,75% (v/v) na formulação, nos estudos efetuados por (Parreidt, Müller , & Schmid, 2018) em que usaram % de alginato; contudo, no mesmo estudo, a WVR diminuiu para concentrações mais altas de glicerol.

### ***2.3.5. Aplicação de revestimentos comestíveis e antioxidantes em processos de fritura***

Presentemente existem diversos trabalhos de investigação nos quais se estuda a degradação térmica nos óleos, bem como a eficiência de vários antioxidantes na degradação de óleos de fritura e avaliação dos antioxidantes termicamente estáveis para maximizar a estabilidade dos mesmos. Segundo Homayouni et al.(2018), a incorporação de antioxidantes na formulação de óleos de mistura pode aumentar os valores nutricionais e estabilidade térmica da mesma.

A absorção de óleo em frituras tornou-se um problema de saúde; o alto consumo de lípidos tem sido relacionado à obesidade e outros problemas de saúde, como doenças cardiovasculares. Reduzir o teor de gordura dos alimentos fritos pela aplicação de revestimentos é uma solução alternativa para atender às preocupações com a saúde e as preferências do consumidor. Os revestimentos de alimentos podem

se tornar uma boa alternativa para reduzir a absorção de óleo durante a fritura. A eficácia de um revestimento é determinada por suas propriedades mecânicas e de barreira, que dependem de sua composição e microestrutura e das características do substrato (García, et al., 2008).

A concentração de óleo na banana frita tem implicações no tempo de vida útil do produto e aceitabilidade do produto pelos consumidores. O dilema da absorção de óleo associado aos produtos fritos como este pode ser limitado usando revestimentos comestíveis à base de hidrocolóides e modificando o processo de fritura durante a etapa de centrifugação de óleo da fritura a vácuo. Este género alimentício, com revestimentos de soluções de goma de guar a 1,5% ou centrifugados a uma velocidade maior que as condições padrão (de 140 a 280 rpm) reduziram a absorção de óleo (Sothornvit, 2011). Do mesmo modo que a goma guar os revestimentos à base de derivados de celulose, como metilcelulose (MC), carboximetilcelulose de sódio (CMC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), revelaram ser uma boa barreira à absorção de óleo durante a fritura (Martínez , Castellanos, & Bravo, 2015).

Outros exemplos de trabalhos relacionados com a aplicação de revestimentos comestíveis, são em batatas e cenouras, onde a incorporação do revestimento de goma xantana evitou alterações na qualidade, textura, rendimento durante fritura, sabor etc., e além disso, diminuiu a absorção de gordura (REFs) (Kilincceker & Hepsag, 2012).

Até à presente data, não foram encontradas referências de trabalhos sobre aplicação de revestimentos comestíveis em peixe para fritar, todavia existem trabalhos ao qual se aplica revestimentos com o intuito de prolongar o tempo de vida útil e melhorar certos parâmetros nutricionais do género alimentício, mais precisamente o *Megalobrama amblycephal*, também conhecido como sargo (Song, Liu, Shen, You, & Luo, 2010).

## 2.4. Macroalgas

As macroalgas e microalgas têm uma grande multiplicidade de organismos diferindo na morfologia, grau de complexidade da estrutura do seu corpo e tamanho. Todas as algas apresentam um pigmento, sendo este, a clorofila presente dentro dos cloroplastos e responsável pela coloração verde, no entanto têm na sua composição outras colorações responsáveis por outros pigmentos. Atente-se que, a coloração da alga é a expressão visível de diferentes pigmentos combinados, presentes nas células (Pereira L. , As algas na nossa alimentação, 2009).

As macroalgas são constantemente expostas a condições ambientais adversas, causando danos nestes organismos embora não sejam visíveis. A sua capacidade de produzir vários metabólitos (enzimas, pigmentos, polissacarídeos, vitaminas, péptidos, fenólicos, tocoferóis, fosfolípidos, etc.) preserva-as de fatores externos (Skroza, et al., 2019).

As mesmas têm uma aplicação muito vasta, desde biocombustível, cosméticos, fertilizante, alimentação animal (ex.: rações para pescado), biorremediação<sup>1</sup>, indústria alimentar, farmacologia (antiviral, antifúngico, anticancerígeno, anti-inflamatório, antiviral, antioxidante), outras aplicações (filtro, mineralógico e pinturas). E têm ganho destaque devido às excelentes fontes de nutrientes, tendo como principais constituintes polissacáridos, devido aos seus numerosos benefícios para a saúde (Hasan-Amer & Carmeli, 2017).

Nutricionalmente, são comumente notórias pelo seu excepcional conteúdo mineral e de oligoelementos, que na sua totalidade podem representar até 55% do peso seco das algas marinhas (seaweed for dogs, 2019). Também, possuem pequenas quantidades de lípidos são principalmente ácidos gordos, omega-3 e omega-6 com classificação polinsaturada. As macroalgas marinhas têm um alto teor de fibras diatéticas, que não pertence aos fatores nutricionais, mas tem efeitos benéficos na saúde do homem (Misurcova, 2011). Os minerais em maior quantidade presentes nestas são, potássio, sódio, fosforo, cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês foram determinadas. E o consumo de uma porção (8 g) dos três grupos de macroalgas (castanhas, vermelhas e verdes) são uma boa fonte de ferro, magnésio e manganês (superior a 25% da ingestão recomendada na dieta) (Astorga, Díaz Romero, Rodríguez, & Rodríguez, 2015). Os oligoelementos com maior relevância são, iodo, ferro, zinco, selênio, cobre, molibdênio, flúor, manganês, boro, cobalto e níquel (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Outros compostos funcionais presentes nas macroalgas são os carotenoides, usados como corantes alimentares, suplementos alimentares e farmacêuticos (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

#### **2.4.1. Grupos de macroalgas**

As macroalgas são organismos fotossintéticos aquáticos pertencentes ao domínio *Eukarya* (Eucariontes) e aos Reinos *Plantae* (algas verdes e vermelhas) e *Chromista* (algas castanhas) (Pereira L., Guia ilustrado das Macroalgas - conhecer e reconhecer algumas especies da flora portuguesa, 2009). As colorações podem ser extremamente variadas, de acordo com a combinação dos diferentes pigmentos fotossintéticos, distinguindo-se três grandes grupos com base na cor: (1) macroalgas verdes; (2) macroalgas castanhas e (3) macroalgas vermelhas. Enumerou-se entre 7.500 e 10.000 espécies de macroalgas, sendo as verdes cerca de 1500, as castanhas 2000 e as vermelhas as restantes (Pereira L., Guia ilustrado das Macroalgas - conhecer e reconhecer algumas especies da flora portuguesa, 2009).

---

<sup>1</sup> uso de microrganismos de proveniência natural, intencionalmente introduzidos, ou a fim de consumir e decompor poluentes ambientais, com o intuito de limpar uma zona poluída.

## **2.4.2. Aplicações na área alimentar**

O primordial uso de macroalgas é para aplicações diretas deste gênero alimentício, sendo o principal mercado mundial. Isso deve-se especialmente ao grande consumo existente nos países asiáticos, onde são produtos tradicionais. As principais algas marinhas usadas como alimento humano são: *Nori* ou *Purple laver* (*Porphyra* spp.), *Aonori* ou *Green laver* (*Monostroma* spp. E *Enteromorpha* spp.), *Kombu* (*Laminaria japonica*), *Wakame* (*Undaria pinnatifida*), *Hiziki* (*Hizikia fusiforme*), *mozuku* (*Cladosiphon okamuranus*), “uvas do mar” ou caviar verde (*Caulerpa lentillifera*), *Dulse* (*Palmaria palmata*), “Musgo irlandês” (*Chondrus crispus*), *winged kelp* (*Alaria esculenta*), “ogo” (*Gracilaria* spp.) e *Callophyllis variegata*. Estas macroalgas são consumidas de diversos modos: secas, sushi, sopas, saladas, chá, molhos, massas alimentícias, panificação e em muitos outros produtos similares. Também contêm alguns compostos, constituídos por polissacarídeos com a capacidade de formar géis (hidrocolóides) derivados de macroalgas. Estes são usados em quase todas as indústrias devido às suas características físico-químicas (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

### **2.4.2.1. Polissacáridos**

As macroalgas marinhas contêm na sua parede celular diferentes polissacáridos estruturais variando segundo a Filo, que utilizam a luz solar como fonte de energia para converter dióxido de carbono e água em hidratos de carbono (Ahmad, 2015). A grande maioria dos polissacáridos não pode ser digerida pelo homem e, portanto, são considerados como fibra alimentar (33% a 75% da composição total).

Alguns polissacáridos de macroalgas com pertinência na indústria alimentar são, galactanos sulfatados, como ágar ou carragenina presentes em macroalgas vermelhas representam um grupo particularmente interessante. Nos últimos tempos, as carragenanas têm sido usadas como aditivos na produção de géis e como espessantes em uma ampla gama de aplicações alimentares. Estes podem ser classificados de acordo com seu uso industrial, diferindo na quantidade e posição de seus substituintes ésteres de sulfato, bem como teor de galactose. A conformação das carrageninas está diretamente relacionada às suas propriedades tecnológicas (isto é, gelificação, espessante). Grande parte das paredes celulares das macroalgas vermelhas é representada pelas galactanas sulfatadas, denominadas como carragenato e ágar (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Nas macroalgas verdes são constituídas por ulvanas, xiloses, manoses e celulosas. A celulose é o principal polissacárido da maioria das paredes celulares das macroalgas marinhas de qualquer tipo (Misurcova, 2011).

Os fucanos, outro tipo de polissacarídeo, geralmente presente nas macroalgas castanhas, são classificados em três grupos: fucoidanos, glicorunogalactofucanos e xilofucoglicuronanos. Os fucoidanos são os principais componentes da fibra solúvel. São ésteres de sulfato de polissacarídeos

ramificados, solúveis em água e ácido, além da fucose, os fucoïdanos também contêm galactose, manose, raminose, ácidos urônicos, glucose e xilose. Os laminaranos são outros tipos de polissacarídeos presentes nas *Laminaria* spp., são responsáveis por desempenhar ações de reservas (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Outros compostos de interesse são os derivados do ácido algínico, também designados de alginatos, são constituídos por polissacarídeos lineares. Os alginatos estão presentes nas macroalgas como alginato de sódio e cálcio, conforme soluções altamente viscosas, utilizadas para diversas aplicações tecnológicas (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

A solubilidade em água dos polissacarídeos de macroalgas, acima mencionados, facilita sua extração para a indústria. De facto, certos ficocolóides presentes nas paredes celulares de diversas macroalgas podem ser facilmente extraídos com água quente. A classificação dos ficocolóides inclui três grupos fundamentais: alginatos, carragenina e ágar. Atualmente, muitos desses compostos estão inseridos em uma ampla variedade de alimentos processados e prontos a consumir (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019). Os ficocolóides também são compostos com ação antivírica, antibacteriana ou anti tumoral, como biofertilizante, fonte de biocombustível, bioindicadores e bioacumuladores (Pereira L., Guia ilustrado das Macroalgas - conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa, 2009). Estes compostos são hidratos de carbono solúveis em água, usados principalmente para aumentar a viscosidade das soluções aquosas, produzir diferentes tipos de géis, formar filmes ou películas solúveis em água e estabilizar alguns géneros alimentícios (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Um exemplo do uso de alginatos extraídos industrialmente de espécies de macroalgas castanhas, como *Macrocystis*, *Ascophyllum* e *Laminaria*, para confeção de gelados, para evitar a formação de grandes quantidades de gelo e proporcionar uma textura cremosa e suave. Esses alginatos também têm sido utilizados para a elaboração de barras energéticas, doces, molhos ou *toppings* para saladas, ou na preparação de xaropes como espessantes e/ou emulsificantes. Os alginatos também podem ser extraídos de macroalgas vermelhas, como *Gelidium*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*, *Pterocladia* e *Ahnfeltia*, mas o uso de alimentos é reduzido a cremes/recheios especiais para panificação, apertizados e como decantadores no fabrico de vinho ou cerveja. No entanto, o uso de ágar na indústria, bem como em laboratórios microbiológicos e analíticos, é muito difundido, principalmente para a preparação de meios de cultura compatíveis com uma ampla variedade de linhas celulares. As carrageninas, também descritas anteriormente, podem ser obtidas de várias espécies de algas marinhas vermelhas como *Eucheuma*, *Chondrus* e *Iridaea*. Seus principais usos são o espessamento e estabilização de alguns produtos lácteos, como xaropes, pudins ou apertizados para animais, e também são utilizados na

elaboração de alguns medicamentos e cosméticos, como champôs e cremes (Gomez-Zavaglia, Lage , Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Na área Alimentar os compostos isolados de macroalgas têm aplicações como espessante, gelificante, estabilizante de suspensões e emulsões. As razões do seu uso é pelo facto de ter como características: carece de sabor, cheiro ou cor, solúveis em água, compatível com grande parte dos alimentos e permite substituir a gordura em derivados lácteos, patês e molhos (Pereira L. , As algas na nossa alimentação, 2009).

#### **2.4.2.2. Antioxidantes**

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (Shami & Moreira, 2004).

Uma quantia excessiva de espécies reativas de oxigénio pode resultar em peroxidação lipídica, alterando a estrutura das biomoléculas do corpo, causando alterações celulares, envelhecimento prematuro, mutações ou lise celular. Diferentes ensaios indicam que capacidade antioxidante nas macroalgas, atribuída à presença de compostos antioxidantes como carotenoides, certos polissacáridos e polifenóis, demonstram atividade de “captura”, capaz de neutralizar espécies reativas de oxigénio, uma vez que tem afinidade com estes compostos (Gomez-Zavaglia, Lage , Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Os carotenoides podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com sua estrutura molecular: carotenoides e xantofilas. O primeiro grupo é caracterizado por ter hidrocarbonetos lineares ou cíclicos em uma ou nas duas extremidades da molécula (como o  $\beta$ -caroteno). Por sua vez, as xantofilas são descritas como derivados oxigenados de carotenos (como violaxantina) e podem ser encontradas em macroalgas verdes. Da mesma forma, as macroalgas castanhas e algumas microalgas flageladas são capazes de produzir outro tipo de xantofilas, como diatoxantina ou fucoxantina (Gomez-Zavaglia, Lage , Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

O carotenoide representa basicamente um papel fotoprotetor nas algas, impedindo que o seu sistema fotossintético seja danificado. Além disso, participam em processos como fototaxia (movimentos resultantes da intensidade da luz) ou fototropismo (movimentos na direção da luz). Algumas microalgas são capazes de gerar grandes quantidades de carotenos em resposta a estímulos externos que causam stresse, para poder adaptar-se face a mudanças. Além disso, os carotenoides têm uma atividade associada à provitamina A. Existem estudos que afirmam que a ingestão diária dessa astaxantina diminui o processo de envelhecimento, pois possui capacidade regenerativa e eliminadora de radicais livres (Gomez-Zavaglia, Lage , Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

As ficobiliproteínas são pigmentos secundários gerados por microalgas, que os ajudam a explorar a energia da luz enquanto os protegem de radiação nociva. Parece que os mecanismos antioxidantes dentro dos organismos que os criam são muito semelhantes aos realizados em matrizes alimentares ou no organismo humano. As principais microalgas que produzem esses compostos são cianobactérias (*Arthrospira platensis* conhecida como *Spirulina*, que produz ficocianina, azul) e criptomonadas, mas também são encontradas em algas vermelhas (*Porphyridium*, que produz fitoeritrina, vermelha) (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Os compostos fenólicos são um grupo de metabólitos secundários que compreendem uma grande variedade de compostos produzidos por plantas terrestres e aquáticas, que incluem, macroalgas. Uma das características mais destacadas são suas propriedades antioxidantes, pois evitam a formação de muitos radicais livres devido à sua capacidade quelante de íons metálicos. Os compostos fenólicos são comumente classificados em cinco grandes grupos: flavonoides (o maior subgrupo e associado a diferentes bioatividades, entre as quais, a atividade antioxidante, lignanas, taninos, tocoferóis e ácidos fenólicos. São compostos comuns em algas, especialmente nas castanhas, já que algumas espécies de macroalgas castanhas possuem clorotaninos, além disso, são compostos até oito anéis interconectados entre si, que conferem propriedades antioxidantes muito maiores do que muitos polifenóis obtidos de plantas terrestres, uma vez que a maioria deles contém apenas três ou quatro anéis em sua estrutura (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

As vitaminas são bem conhecidas por sua alta capacidade antioxidante. Todavia, quando reproduzidas artificialmente sua síntese, foi notada uma diminuição na atividade em relação àquelas obtidas diretamente de matrizes naturais. É por isso que novas fontes naturais que contêm vitaminas essenciais são pesquisadas continuamente. Entre elas, a biomassa de microalgas contém a maioria das vitaminas essenciais (por exemplo, A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, nicotinato, ácido fólico de biotina e ácido pantotênico), além de uma variedade interessante de minerais (por exemplo, Na, K, Ca, Mg, Fe e Zn).

As macroalgas marinhas também são ricas em compostos bioativos com atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumorais, antivirais e antioxidantes. Metabólitos secundários como carotenóides, tocoferóis, terpenos e compostos fenólicos podem ser considerados antioxidantes naturais, com várias aplicações potenciais na indústria de alimentos. Antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) contêm uma estrutura fenólica que permite doar um átomo de hidrogênio a um radical livre, regenerando a molécula de acilglicerol e interrompendo o processo de oxidação do radical livre (Gomez-Zavaglia, Lage, Jimenez-Lopez, Mejuto, & Simal-Gandara, 2019).

Especificamente a *C. tomentosum* contém na sua composição proteínas com propriedades antioxidantes, compostos fenólicos, como flavonoides e cumarinas, tocoferóis, azoto com compostos

incluindo alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos e amins, bem como outros compostos como carotenoides, ácido ascórbico, glutathione e ácido úrico. Fitoquímicos como compostos fenólicos e ácidos orgânicos podem estar envolvidos na proteção contra várias doenças, devido ao seu potencial antioxidante (Valentão, et al., 2010).

Neste trabalho a importância das algas deve-se ao facto de poderem ser uma fonte de polissacáridos, (alginato, p.e.) para formar a estrutura de revestimentos comestíveis, e de compostos antioxidantes (compostos fenólicos, p.e.). Conjuntamente recorreu-se ao conceito da economia circular e utilizaram-se macroalgas da costa portuguesa e estipulou-se usar um hidrocoloide presente nas macroalgas castanhas na formulação base dos revestimentos comestíveis.

### 3. Materiais e Métodos

#### Material Biológico

##### Macroalgas

A identificação e recolha das macroalgas (tabela 1) foi efetuada pela professora Teresa Mouga da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Politécnico de Leiria, na data de junho de 2018 excetuando a *Codium Tomentosum* que foi fornecida pela empresa Algaplus.

Após a receção do material fresco foi limpo e separado de outros compostos, essencialmente, outras espécies e areia. De seguida, foi seco a 40°C no secador de tabuleiros, moído e congelado no Telstar Igloo (U445, Itália) a -20°C e posteriormente armazenado à temperatura ambiente até serem extraídas.

**Tabela 1-** Descrição do material biológico por espécie, lote/ano, exemplar, origem e grupo.

Material biológico	Lote/ano	Imagem	Origem	Grupo de Macroalgas
<i>Codium tomentosum</i>	2018	 (Jacinto, 2009)	Empresa Algaplus	Verde
<i>Porphyra umbilicalis</i>	2018	 (Aphotomarine, 2019)	Praia de Pedras do Corgo, Leça da Palmeira	Vermelha

<i>Pelvetia canaliculata</i>	2018	 (Connor, et al., 2019)	Praia de Pedras do Corgo, Leça da Palmeira	Castanha
<i>Gelidium</i> <sup>2</sup>	2018	 (Pereira, Silva, & Costa, Portuguese Seaweed Website, 2008)	Praia de Pedras do Corgo, Leça da Palmeira	Vermelha
<i>Fucus spirulis</i>	Junho de 2018	 (Algaebase, 2013)	Praia de Pedras do Corgo, Leça da Palmeira	Castanha

### Filetes de peixe

A espécie utilizada foi a *Scomber Colias*, comumente conhecida como cavala, foi recolhida na praia da Riviera da Costa da Caparica na data de 25 de julho de 2019. Para se proceder ao acondicionamento desta, começou-se por lavar, esviscerar e cortar os lombos em porções 3x2 cm e prontamente colocou-se à temperatura -18°C no congelador Electrolux (EUF2744AOX No frost, Suíça) sem emergir nas soluções filmogénicas.

### 3.1. Procedimento de obtenção dos extratos das macroalgas

A biomassa seca e moída (50 g) foi extraída com 500 mL de água à temperatura ambiente, sob agitação durante duas horas. Após filtração da mistura, recolheu-se o filtrado que foi congelado a -80°C e liofilizado no liofilizador de bancada Labogene (Collsafe 55-4, Espanha) para remoção da água.

<sup>2</sup> Só se classificou quanto ao género

### 3.2. Caracterização dos extratos de macroalgas

Os extratos obtidos foram identificados de acordo com a tabela 2 e caracterizados em termos de teor de hidratos de carbono, fenóis totais, atividade antioxidante (FRAP, DPPH, ABTS), de acordo com os procedimentos descrito a seguir, anexo 11. Para todas as metodologias foram efetuados triplicados.

**Tabela 2-** Identificação dos extratos de macroalgas

Abreviaturas	Designação
E <sub>1</sub>	Extrato aquoso de <i>Codium tomentosum</i>
E <sub>2</sub>	Extrato aquoso de <i>Codium tomentosum</i> obtido a partir de biomassa previamente extraída com etanol.
E <sub>3</sub>	Extrato aquoso de <i>Porphyra umbilicalis</i>
E <sub>4</sub>	Extrato aquoso de <i>Pelvetia canaliculata</i>
E <sub>5</sub>	Extrato aquoso de <i>Gelidium</i>
E <sub>6</sub>	Extrato aquoso de <i>Fucus spirulis</i>

#### 3.2.1. Quantificação dos Compostos fenólicos – Método direto

Com o intuito de contabilizar os compostos fenólicos recorreu-se ao método segundo Ribereau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdiu (2006). Pesou-se 1 mg de cada extrato para balões volumétricos de 10 mL e perpez-se o volume com água destilada. Para uma melhor homogeneização levou-se as amostras a ultrassons Elma Transsonic T700 (ProfiLab24, Alemanha) durante 10 minutos e posteriormente ao vórtex VV3 (VWR, Portugal) 10 segundos, velocidade 3.

Posteriormente, levou-se as amostras à centrifuga Z383 K (HermLe, Alemanha) durante 10 min à velocidade 10.000 rpm à temperatura de 16°C. Por fim, retirou-se o sobrenadante e colocou-se em cuvettes de quartzo para se proceder à medição das absorvância no espectrofotómetro UV 4 (Unicam, Portugal) a  $\lambda=280$  nm com o programa de leitura Vision versão 3.31. O branco é feito com água nanopura.

#### Curva de calibração com o EAG para o método Compostos fenólicos

Com o intuito de se obter a curva de calibração dos compostos fenólicos, que se encontra no Anexo IV, utilizou-se o reagente Ácido Gálico (Acros organics) como padrão. Assim, prepararam-se as soluções de em água com concentrações finais entre 100 a 1000  $\mu$ M.

#### 3.2.2. Determinação dos Açúcares totais- Método de Dubois ou fenol sulfúrico

Os açúcares presentes nas macroalgas marinhas são: xiloses, manoses, glucose, celulose, arabinose, fucose, ácido galactúrico, galactose. Os açúcares simples, oligossacáridos, polissacáridos e seus

derivados, incluindo os éteres metílicos com grupos redutores livres ou potencialmente livres, apresentam uma cor amarelo alaranjado quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado (Fiset, Liefer, Irwin, & Finkel, 2017). O teor de açúcares solúveis totais dos extratos de macroalgas foi determinado pelo Método de Dubois ou fenol sulfúrico, adaptado (Wei, Xi, Wang, & Chu, 2010). Pesaram-se numa balança analítica 10 mg de extrato para um balão volumétrico de 10 mL e perfiz-se o volume com água destilada. Para uma melhor solubilização, levaram-se as amostras ao vórtex durante 1 min, velocidade 4. Posteriormente, retirou-se 0,5 mL de cada uma das soluções preparadas para tubos de ebulição e adicionou-se uma solução Fenol (5%) (25 g em 0,5 L água) e de ácido sulfúrico (96%) (250 mL) levou-se ao vórtex durante 30 segundos, velocidade 4<sup>3</sup>. O aquecimento dos tubos resultou apenas da adição do HCl e da solução de Fenol. Para uma maior celeridade do processo, deixou-se os tubos de ebulição arrefecer em água fria até ficarem à temperatura ambiente. No final, mediu-se a absorvância no espectrofotómetro a  $\lambda=490$  nm. O branco foi feito com água destilada.

#### Curva de calibração do padrão para o método Dubois

Para a aquisição da curva de calibração do método de Dubois, no Anexo V, usou-se o reagente malto-dextrina (Sigma Aldrich) como padrão. Desta forma, para obter a curva, prepararam-se diferentes soluções padrão de malto-dextrina com Fenol (5%) e ácido Sulfúrico (96%), com concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . O procedimento foi realizado em triplicado.

### **3.2.3. Determinação da Atividade antioxidante total**

Os métodos usados para determinar a quantidade de antioxidantes nos extratos atuam de maneiras diferentes, contabilizam diferentes analitos na solução e são medidos no espectrofotómetro.

#### **3.2.3.1. Pela captura do radical livre de DPPH**

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de macroalgas pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), foi efetuada de acordo com Rufino *et al.* (2007). O DPPH apresenta uma coloração roxa escura, contudo devido à ação de um antioxidante ou quando o radical o DPPH é reduzido, forma 2,2 difenil-1-picril-hidrazina adquirindo uma coloração amarela, podendo a mesma ser controlada pelo decréscimo da absorvância (Rufino M. D., et al., 2007).

Preparou-se uma solução mãe de DPPH 0,6 mM, por dissolução de 24 mg de DPPH (Sigma Aldrich) em metanol (Sigma Aldrich) até volume final de 100,0 mL (balão volumétrico). Esta solução foi mantida no frio ao abrigo da luz. A solução diária de DPPH foi obtida por diluição da solução mãe (10mL) com metanol (40 mL) e determinou-se a respetiva absorvância a  $\lambda=515$  nm (que deveria ser inferior a 1,1), num espectrofotómetro UV 4 (Unicam, Portugal) com o programa de leitura *Vision* versão 3.31

---

<sup>3</sup> Este passo experimental é efetuado na *hotte*

usando-se água como branco. Preparam-se, em tubos de Falcon, soluções dos extratos a analisar por dissolução de 10 mg (medidos rigorosamente) de extrato em 1 mL solvente (H<sub>2</sub>O) e levaram-se os tubos ao vórtex *Mixer* (Velp Científica, Itália) durante 1 minuto. As soluções E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> e E<sub>6</sub> foram colocadas num banho de ultrassons Elma Transsonic T700 (ProfiLab24, Alemanha) (5 min) para uma melhor dissolução. De forma a avaliar a capacidade antioxidante dos extratos, adicionou-se 100 µL extrato a 3,9 mL de solução diária de DPPH em tubos de ensaio. Simultaneamente, preparou-se a solução referência – o branco (radical) com 0,1 mL de metanol e 3,9 mL de DPPH. Após, agitaram-se as misturas num vórtex *Mixer* (Velp Científica, Itália) durante 1 minuto e deixou-se reagir no escuro durante 40 minutos. Após esse tempo, mediu-se a absorvância das amostras e do branco com o programa de leitura *Vision* versão 3.31 através do espectrofotómetro UV 4 (Unicam, Portugal) a λ=515 nm. De forma a proceder à leitura da absorvância das amostras calibrou-se o equipamento com metanol.

A partir dos valores de absorvância obtidos foi calculado o RSA (*Radical Scavenging Activity*) expresso em percentagem, através da equação 1:

$$RSA = \frac{Abs_{radical} - Abs_{extrato+radical}}{Abs_{radical}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

**RSA (%)** – designa um quociente, no qual o numerador é dado pela diferença da absorvância do radical e a absorvância do extrato com o radical e no denominador a absorvância do radical. Este parâmetro é expresso em percentagem, sendo o quociente multiplicado por 100.

**Abs-** Denomina absorvância, parâmetro adimensional, que consiste na medida da intensidade de luz absorvida por uma solução corada pela redução da medida da intensidade da luz transmitida. Note-se que a absorvância não é uma quantidade medida diretamente, mas é obtida através de um cálculo matemático a partir dos valores de transmitância.

Os resultados da atividade antioxidante referente às amostras foram expressos em valores de TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidante Capacity*) (Equação 2), que corresponde à capacidade antioxidante de um composto, em termos de µmol de *trolox*/ mg de extrato.

$$TEAC = \frac{\mu mol \text{ de } trolox}{mg \text{ de extrato}} \quad (2)$$

Onde:

**TEAC (µmol de Trolox/ mg de extrato)** – É expresso pelo quociente do número de mol (µmol de *Trolox*) pela quantidade ou massa de extrato (mg).

#### Curva de calibração com o *Trolox* para o método DPPH

De forma a converter o valor de RSA das amostras em *trolox* foi elaborada uma curva de calibração utilizando o reagente *trolox* (Acros organics) como padrão. Apresentando-se no Anexo I a respetiva

curva. Para a elaboração desta, foram preparadas diferentes soluções de *trolox* em etanol com concentrações entre 100  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$ , de forma a reagir com o DPPH, utilizando o procedimento acima mencionado para as amostras. O procedimento foi realizado em triplicado.

### 3.2.3.2. Pela redução do ferro- FRAP

O FRAP baseia-se na formação do íão  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa) a partir da redução do íão  $\text{Fe}^{3+}$  (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Quando a redução sucedesse, há uma alteração na tonalidade da solução, passando de roxo claro a um roxo mais intenso (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do FRAP foi determinada de acordo com o descrito por (Rufino M. d., et al., 2006). O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de três soluções: 25 mL solução de tampão acetato (Sigma Aldrich) 0,3 M com pH 3,6; 2,5 mL de solução TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina) (Sigma Aldrich) 10 mM; e 2,5 mL de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (Pancreae) 20 mM. As soluções dos extratos a analisar foram preparadas em tubos de Falcon por diluição de 5 mg (pesados rigorosamente) em 1,00 mL de água. A reação de cor foi feita em tubo de ensaio por adição de 45  $\mu\text{L}$  de extrato, 45  $\mu\text{L}$  do solvente de extração ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 2,7 mL de reagente FRAP e 0,27 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Para a preparação do branco adicionaram-se 2,7 mL de FRAP; 0,27 mL de água destilada e 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Depois os tubos de ensaio foram agitados e colocados durante trinta minutos em banho-maria Labortechnik (Kottermann, Alemanha) a 37°C com agitação e cobertos com folha de alumínio.

De seguida, foi medida a absorvância a  $\lambda=515$  nm das soluções preparadas num espectrofotómetro UV 4 (Unicam, Portugal) com o programa de leitura Vision versão 3.31 A atividade antioxidante das amostras foi expressa através do TEAC (Equação 2).

#### Curva de calibração com o Trolox para o método FRAP

A partir de soluções padrão de *trolox* de concentrações entre 100  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$ , tratadas nas mesmas condições das amostras, construiu-se uma curva de calibração Abs a 515 nm *versus* concentração de *trolox* (ver anexo 2). A atividade antioxidante das amostras foi expressa em equivalentes de  $\mu\text{mol}$  de *trolox* por mg de extrato (TEAC). Todos os procedimentos foram realizados em triplicado.

### 3.2.3.3. Pela captura do radical livre de ABTS

Um dos métodos recorrentes para medir atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) conhecido como ABTS. Quando se dá a estabilização do radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  por um antioxidante e a formação de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_5$ ), a solução muda da cor verde escura para verde clara. A determinação da atividade antioxidante dos extratos pelo método do radical ABTS foi realizada de acordo com o descrito por (Rufino M. D., et al., 2007).

Preparou-se uma solução do radical de ABTS<sup>•+</sup> (Sigma Aldrich) por adição de 5 mL de uma solução Mãe 7 mM de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) com 88 µL de solução de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Pancreae) 140 mM. Esta solução foi mantida durante 16h e à temperatura ambiente no escuro. Após este período, a solução do radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em metanol (cerca de 2 mL de radical ABTS<sup>•+</sup> para 120 mL metanol) até que se obter uma absorvância de  $0,700 \pm 0,05$  a  $\lambda=734$  nm com o programa de leitura *Vision* versão 3.31. O branco foi feito com metanol.

Posteriormente, em ambiente escuro misturou-se 15 µL extrato com 15 µL solvente (H<sub>2</sub>O), com 3 mL de solução de radical de ABTS<sup>•+</sup> em tubos de ensaio. Ao mesmo tempo preparou-se a solução referência através de 3 mL de ABTS com 30 µL de H<sub>2</sub>O. De seguida, levaram-se as amostras ao vórtex VV3 (VWR, Portugal) por 30 segundos, velocidade 4, para homogeneizar. Após 6 min, fez-se as leituras da absorvância a  $\lambda=734$  nm no espectrofotómetro UV-Vis 4 (Unicam, Portugal) com o programa de leitura *Vision* versão 3.31. O zero do equipamento foi preparado com água.

Com base nos valores de absorvância obtidos, calculou-se o RSA (*Radical Scavenging Activity*) expresso em percentagem por aplicação da equação 1.

A atividade antioxidante das amostras foi expressa em TEAC (µmol de *trolox* por mg de extrato) com base na curva de calibração construída com soluções de *trolox* de concentrações entre 250 a 2000 µM, tratadas nas mesmas condições acima descritas de forma a reagir com o ABTS (anexo III).

#### Curva de calibração com o Trolox para o método ABTS

Com o intuito de se obter a curva de calibração do ABTS, que se encontra no Anexo III, também se utilizou o reagente *Trolox* (Acros organics) como padrão tal como no caso do DPPH e FRAP. Assim, prepararam-se as soluções de *trolox* em etanol com concentrações finais entre 250 a 2000 µM nas mesmas condições acima descritas de forma a reagir com o ABTS.

#### **3.2.4. Capacidade de formação de películas**

Na segunda etapa começa-se por testar vários tipos de formulações e a base da constituição das soluções filmogénicas são hidrocolóides. Para a preparação das películas e é indispensável a adição de um plastificante, por exemplo o glicerol, para evitar que fique quebradiço. Os plastificantes são aditivos que, proporcionam mobilidade molecular e flexibilidade das películas em função da interação com as cadeias dos hidrocolóides (Garcia, Coelho, & Silva, 2016).

Nas tabelas 3,4 e 5 estão as formulações selecionadas e testadas, das películas com as abreviaturas correspondentes.

### **3.3. Preparação e caracterização de películas bioativas**

A preparação das películas e a caracterização das mesmas está esquematizada no anexo 11.

### 3.3.1. Preparação de películas utilizando diretamente os extratos macroalgas

Apesar da primeira metodologia do trabalho experimental ser a caracterização dos extratos foi-se testar primeiramente se formavam películas, para perceber quais os extratos a utilizar, bem como o método de produção das mesmas. Primeiramente, testaram-se as formulações da tabela 3, onde se encontram apresentadas as quantidades de solvente, plastificante e extrato misturadas à temperatura ambiente. Variou-se o tipo de extrato adicionado, mantendo sempre a quantidade de glicerol a 30% (massa de glicerol/massa extrato).

**Tabela 3-** Soluções filmogénicas a partir de extratos de Macroalgas da tabela 1.

**Legenda:** Extrato 1- *Codium tomentosum*, Extrato 2 - *Codium tomentosum\**, Extrato 3 - *Porphyra umbilicalis*, Extrato 4 - *Pelvetia canaliculata*, Extrato 5 - *Gelidium*, Extrato 6 - *Fucus spirulis*.

Extratos	Quantidade de extrato (g)	Quantidade de solvente – H <sub>2</sub> O(g)	Quantidade de plastificante - Glicerol(g)	Concentração de extrato (%)
1	0,19	19,91	0,08	1
2	0,19	19,96	0,08	1
3	0,11	9,94	0,04	2
4	0,05	5,06	0,04	4
5	0,11	9,97	0,04	2
6	0,05	5,01	0,06	4

Subsequentemente, testou-se a junção das soluções dos extratos 1 e 2 aproveitando assim o material biológico, duplicando-se assim a concentração de extrato na solução filmogénica. As amostras 1 e 2 puseram-se para uma só caixa de petri aumentando a concentração global para 2% de extrato. Para retirar o conteúdo das amostras 1 e 2 das caixas de Petri utilizou-se um volume de 20 mL de H<sub>2</sub>O para facilitar a extração. A produção desta película com uma concentração de 2% de extrato foi feita a quente(80°C) para uma melhor homogeneização da solução.

A formulação da solução filmogénica está descrita na tabela 4 com as respetivas quantidades.

**Tabela 4 –** Solução filmogénica a partir dos extratos da **Amostra 1 + 2** ficando com 2% extrato.

**Legenda:** Extrato 1- *Codium tomentosum*, Extrato 2 - *Codium tomentosum\**

Extratos	Quantidade de extrato (g)	Quantidade de solvente – H <sub>2</sub> O(g)	Quantidade de plastificante - Glicerol(g)	Concentração de extrato (%)
1+2	0,38	19,93	0,17	2

Prepararam-se ainda mais três soluções filmogénicas, dado que nenhuma das anteriores formou película, cujas características estão descritas na tabela 5.

**Tabela 5-** A amostra **Y** representa a solução filmogénica com alginato, a **Z** a solução filmogénica do extrato 1 a 5% e a **W** a solução filmogénica do extrato 1 a 10%.

**Legenda:** Amostra Y- Alginato, Amostra Z- *Codium tomentosum* a 5%, Amostra W- *Codium tomentosum* a 10%.

Amostras	Quantidade de extrato (g)	Quantidade de solvente – H <sub>2</sub> O (g)	Quantidade de plastificante (g)
Y	0,20	20,16	0,09
Z	0,50	10,02	0,15
W	0,98	9,96	0,29

1% de alginato (m/m solução) + 30% de glicerol (m/m alginato) + 20 mL H<sub>2</sub>O → Amostra Y

5% de *Codium tomentosum* (E<sub>1</sub>) + 30% de glicerol (m/m extrato) + 10 mL H<sub>2</sub>O → Amostra Z

10% de *Codium tomentosum* (E<sub>1</sub>) + 30% de glicerol (m/m extrato) + 10 mL H<sub>2</sub>O → Amostra W

### 3.3.2. Preparação de películas bioativas à base de alginato e gelatina de peixe

Na tabela 6 estão apresentadas as soluções filmogénicas escolhidas para aplicar nos filetes de peixe. Foram preparadas por dissolução do extrato em água destilada, de seguida adicionando-se o glicerol, e por fim o polímero sob agitação magnética (Advanced Vortex Mixer, Velp Científica, Itália) na velocidade 4 durante 3,5h até ficarem homogéneas. No caso em estudo as percentagens incorporadas do plastificante no caso das películas de alginato foram 30%(v/v) e no caso da gelatina de peixe foram 20%(v/v). Por fim, transferiu-se as soluções para caixas de Petri (9 cm de diâmetro) devidamente identificadas para depois levar à Estufa WTC (Binder, EUA) a 40°C durante 48h. Para cada ensaio, preparou-se cerca de 18 caixas de petri (triplicado de cada solução filmogénica) de forma a obter películas suficientes para realizar todos os testes de caracterização.

**Tabela 6** - Abreviaturas/Siglas das formulações selecionadas

Formulação dos revestimentos	Abreviatura
------------------------------	-------------

1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H <sub>2</sub> O.	<b>Alg</b>
1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H <sub>2</sub> O, 30% (m/m alginato) de extrato 1 – <i>Codium tomentosum</i> .	<b>AlgE<sub>1</sub></b>
1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H <sub>2</sub> O, 30% (m/m alginato) de extrato 6 – <i>Fucus spirulis</i> .	<b>AlgE<sub>6</sub></b>
5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H <sub>2</sub> O.	<b>Gel</b>
5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H <sub>2</sub> O, 30% (m/m gelatina de peixe) de extrato 1 – <i>Codium tomentosum</i> .	<b>GelE<sub>1</sub></b>
5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H <sub>2</sub> O, 30% (m/m gelatina de peixe) de extrato 6 – <i>Fucus spirulis</i> .	<b>GelE<sub>6</sub></b>

### 3.3.3. Determinação da atividade antioxidante das películas bioativas

Os antioxidantes presentes nas macroalgas marinhas são compostos bioativos que desempenham um papel indispensável na prevenção de doenças associadas ao envelhecimento das células, defendendo-as contra os danos oxidativos (Youngson, 1995).

#### 3.3.1.1. Pela redução do ferro- FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante nas películas usou-se a mesma metodologia descrita no ponto 3.2.3.2., diferindo apenas no tipo de amostra. Visto que, nesta etapa já não se labora com extrato, mas películas, colocando uma área de 3x1 (cm), cerca de 4 mg no caso da gelatina de peixe e 1,6 mg nas de alginato, aproximadamente nos tubos de ensaio em vez dos 45 µL de extrato.

#### 3.3.1.2. Pela captura do radical livre ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante nas películas usou-se a mesma metodologia descrita no ponto 3.2.3.3., diferindo apenas no tipo de amostra. Visto que, nesta etapa já não se labora com extrato, mas películas, colocando uma área de 3x1 (cm), cerca de 4 mg no caso da gelatina de peixe e 1,6 mg nas de alginato, nos tubos de ensaio em vez dos 15 µL extrato.

### 3.3.2. Medição da cor

Para a determinação da cor, utilizou-se um colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta, Japão) que fornece parâmetros da cor (L\*, a\* e b\*). Antes de se efetuarem as medições, calibrou-se o colorímetro com um padrão branco e foram efetuadas quatro medições dos triplicados de cada película nas mesmas condições de luminosidade (luz artificial).

O modelo utilizado foi o CIELAB que circunscreve três coordenadas tridimensionais:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . O  $L^*$  diz respeito à luminosidade (varia entre 0 e 100%, correspondendo o 0 ao preto e o 100 ao branco). O  $a^*$  e o  $b^*$  dizem respeito ao cromatismo (o seu valor varia entre -60 e +60) onde o  $a^*$  indica-nos o valor associado ao vermelho/verde e o  $b^*$  o valor associado ao amarelo/azul (X-rite, 2007).

Este modelo tridimensional pode ser retratado esquematicamente como na Figura 1: o  $L^*$  encontra-se representado no eixo vertical, enquanto que o  $a^*$  e o  $b^*$  se encontram representados nos eixos horizontais. O ponto central (0,0,0) representa o cinzento (X-rite, 2007).

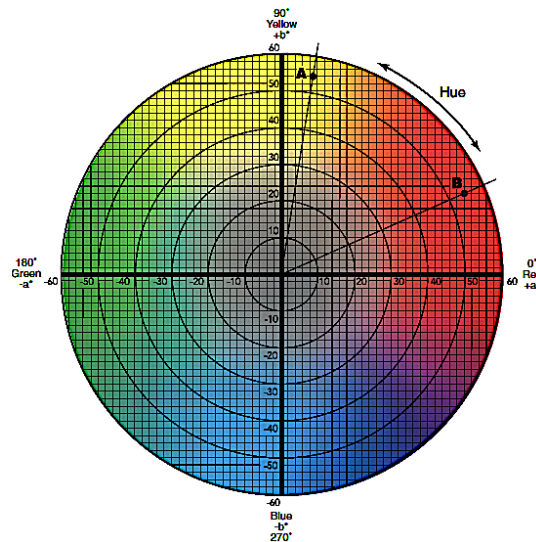


Figura 6- Representação esquemática do modelo CIELAB (X-rite, 2007)

Pode-se ainda obter outros dois parâmetros a partir deste modelo: o  $C^*$  (saturação da cor) e o  $h^\circ$  (matiz da cor) (X-rite, 2007).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \tag{4}$$

Onde:

$C^*$ - Cromatismo ou saturação da cor expresso de acordo com o modelo CIELAB

$a^*$ - Denomina um valor que varia (eixo horizontal) entre a tonalidade vermelho a verde (+60 a -60), expresso de acordo com o modelo CIELAB

$b^*$ - Denomina um valor que varia (eixo vertical) entre a tonalidade amarelo a azul (+60 a -60), expresso de acordo com o modelo CIELAB

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \tag{5}$$

Onde:

$h^\circ$  - ângulo (graus ou radianos) formado entre o parâmetro  $a^*$  e  $b^*$  de acordo com o modelo CIELAB

$a^*$ - Denomina um valor que varia (eixo horizontal) entre a tonalidade vermelho a verde (+60 a -60), expresso de acordo com o modelo CIELAB

**b\***- Denomina um valor que varia (eixo vertical) entre a tonalidade amarelo a azul (+60 a -60), expresso de acordo com o modelo CIELAB

Repare-se que a equação 3 está simplificada devido às unidades (radianos), para convertê-la para graus é necessário examinar os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  para escolher a equação a usar (X-rite, 2007).

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \cdot 180/\pi, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (6)$$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \cdot 180/\pi + 180, \text{ se } a^* < 0 \quad (7)$$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \cdot 180/\pi + 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (8)$$

### 3.3.3. Procedimento da medição espessura

Após a total secagem das películas, retiram-se cuidadosamente das caixas de petri com auxílio de uma pinça e uma espátula. Mediu-se a espessura das películas com o auxílio micrómetro digital (Digimic IP 54, Mitutoyo, Japão).

## 3.4. Aplicação de revestimentos comestíveis a filetes de cavala sujeitos a fritura

### 3.4.1. Preparação das amostras

Para proceder à aplicação das soluções filmogénicas à matriz da cavala cortou-se os lombos da cavala com as seguintes proporções 3x2 cm de e prontamente colocou-se à temperatura -18°C no congelador Electrolux (EUF2744AOX No frost, Suíça) acondicionadas e devidamente identificadas.

Paralelamente, preparou-se as soluções filmogénicas, para depois os filetes da cavala serem imersos nessas mesmas soluções e de seguida serem fritos em óleo (girassol e colza). Note-se que há, mesmo número, amostras de peixe que serão fritos sem os revestimentos e de peixe fresco que não será frito, como método de comparação.

### 3.4.2. Processo de Fritura

No processo de fritura colocaram-se seis amostras (filetes de cavala) submersas em cada tipo de solução (descritas na tabela 6) em tempos iguais (30 segundos), não esquecer que há um lote de 6 amostras que serão fritos sem adição da solução filmogénica e um outro lote de peixe fresco que não será frito (padrão).

A seguir, os filetes de cada lote foram fritos em simultâneo, durante 2 minutos e 30 segundos, em óleo (girassol e colza) previamente aquecido à temperatura de 180°C, numa fritadeira elétrica Tefal (FR804015, França). Após a fritura, deixou-se escorrer o excesso de óleo dos filetes, durante 4 minutos, para o papel absorvente.

Entre as frituras, o óleo usado foi descartado, a fritadeira foi devidamente lavada e seca e cheia com óleo novo. Procedeu-se ainda à fritura de um lote de filetes sem adição de qualquer solução filmogénica.

No final, as amostras do peixe frito com e sem revestimento foram acondicionadas, etiquetadas e colocadas no congelador Electrolux (EUF2744AOX No frost, Suíça) a  $-180^{\circ}\text{C}$ . Em paralelo, congelaram-se também 6 filetes de peixe cru para posterior análise.

### ***3.4.3. Caracterização dos filetes de cavala antes e após fritura***

Os hidrocolóides são vastamente aplicados em inúmeros produtos alimentares e verificou-se que executam um papel adicional apto de impedir a absorção excessiva de óleo durante o processo de fritura. Este composto também tem propriedades de barreira aos gases e humidade quando fabricado com a finalidade de revestimento. Como estes polímeros são altamente hidrofílicos e apresentam apenas uma permeabilidade limitada à humidade, enquanto como barreiras a gases são muito eficazes e protegem contra a oxidação lipídica (Porta, et al., 2012).

Antes de iniciar o estudo acerca absorção e alteração do perfil de gordura é fulcral a preparação das amostras.

#### **3.4.3.1. Determinação do teor de lípidos totais**

Os lípidos exercem múltiplas funções biológicas essenciais nos organismos vivos, designadamente, armazenamento e transporte de energia, formação de membranas celulares e manutenção da sua integridade estrutural, fornecimento de ácidos gordos essenciais para as estruturas celulares e para a síntese das prostaglandinas e transporte de vitaminas lipossolúveis (Ipma, 2019).

O teor de lípidos totais das 8 amostras de cavala (filetes crus; filetes fritos sem revestimento; Filetes fritos após revestimento com cada uma das soluções filmogénicas) foi determinado por gravimetria pelo método de Folch (Folch, Lees, & Sloane, 1957), adaptado tal como descrito por (Cherian, Holsonbake, & Goeger, 2002) (Iverson, Lang, & Cooper, 2001).

Primeiramente o peixe de cada lote foi triturado ainda congelado, numa picadora Flama (Picatti 1705 Fl, Portugal) e depois dividido em três porções (triplicado). De cada uma das porções, retirou-se uma amostra de massa conhecida (aproximadamente 1 g) para tubos de Falcon devidamente identificados e adicionaram-se 5 mL de reagente Folch ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 2:1) (Charlotte, NC, USA). A mistura foi homogeneizada durante 1 min (Pellet Mixer, VWR, Portugal) e adicionaram-se mais 5 mL de solução Folch. Posteriormente, agitou-se a mistura no vórtex VV3 (VWR, Portugal) durante 5 min, velocidade 5, adicionou-se 1,2 mL de NaCl a 0,8%. e voltou-se a homogeneizar no vórtex por 2 min, velocidade 4.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Alemanha) a 6000 rpm durante 10 min a 4°C de forma a promover a separação de fases. A seguir, recolheu-se cuidadosamente a fase inferior (clorofórmio, mais densa) com uma pipeta Pasteur de vidro e filtrou-se através de uma coluna de sulfato de sódio anidro (preparada numa ponta de uma micropipeta de 10 mL com algodão no fundo) para um balão periforme previamente tarado. Para aumentar o rendimento da extração, adicionaram-se mais 5 mL de CHCl<sub>3</sub> à mistura restante e repetiu-se a homogeneização no vórtex e a centrifugação. Depois retirou-se a restante fase de clorofórmio para o balão periforme. No fim, evaporou-se o solvente sob baixa pressão num rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Alemanha) e levou-se à estufa a 50°C até peso constante. O teor de lípidos das amostras foi expresso em percentagem e calculado por aplicação da equação 9.

$$\text{Lípidos totais(\%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_3} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

**m<sub>1</sub>** – massa em gramas do balão periforme com a gordura das amostras

**m<sub>2</sub>**- massa em gramas do balão periforme sem amostra(vazio)

**m<sub>3</sub>**- massa em gramas da amostra

#### 3.4.3.2. Caracterização do perfil de ácidos gordos dos filetes de cavala

Para a análise do perfil de ácidos gordos dos filetes de cavala, procedeu-se à transmetilação direta das amostras de cada lote (filetes crus; filetes fritos sem revestimento; Filetes fritos após revestimento com cada uma das soluções filmogénicas) de acordo com (Fernández et al. ., 2015).

Para tubos de ensaio, pesaram-se rigorosamente 50 mg de cada amostra (em triplicado) e adicionaram-se 2 mL de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v / v) em metanol.

Em seguida, os tubos foram bem fechados e colocados num banho a 80 °C Labortechnik (Kottermann, Alemanha) durante 2 horas. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, foram adicionados 1 mL de água destilada e 2 mL de hexano a cada tubo, a mistura foi agitada no vórtex VV3 (VWR, Portugal) durante 1 min velocidade 4, e centrifugada Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Alemanha) a 1000 rpm durante 5 min a 4°C. No fim, transferiu-se cuidadosamente um volume conhecido da camada de hexano contendo os esteres metílicos dos ácidos gordos (FAMES) para frascos de cromatografia gasosa aos quais se adicionou padrão interno (C17 FAME 514 µg/mL em hexano). As proporções das amostra e padrão interno foram: 20 µL + 600 µL amostra crua e 100 µL + 500 µL amostras fritas.

A análise cromatográfica foi realizada no cromatógrafo gasoso (GC) Finnigan Ultra Trace equipado com coluna capilar Thermo TR-FAME (60 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura da

membrana), um *auto sampler* AS 3000 da Thermo Electron Corporation e um detetor de ionização de chama (FID).

As temperaturas do detetor e do injetor (em modo *splitless*) foram respetivamente de 250 e 280 °C. Programa de temperatura do forno: 100 °C por 1 min, aumento de 10°C / min a 160 °C (permanece por 10 min), segundo aumento de 4 °C / min a 235 °C (durante 10 min). Gás de arraste: hélio a um fluxo de 1,5 mL / min. Ar e hidrogénio foram fornecidos ao detetor com fluxos de 350 e 35 mL / min, respetivamente. O *software Xcalibur* foi usado para controlar o instrumento, aquisição de dados e análise dos dados (integração, tempos de retenção e áreas de pico). Os ácidos gordos presentes nas amostras foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos respetivos FAMES com o dos componentes da mistura Supelco 37 (Sigma-Aldrich, lote LRAB8645). A quantificação dos ácidos gordos presentes nas amostras, foi efetuada pelo método do padrão interno de acordo com a equação 10:

$$[AG_x] = \frac{[PI_x] \times Area_x}{Area_{PI}} \quad (10)$$

Onde:

[AG<sub>x</sub>] - concentração na solução analisada (µg/mL) de cada um dos componentes detetados na amostra.

[PI<sub>x</sub>] - concentração (µg/mL) do padrão interno na solução analisada

Area<sub>x</sub> - valor absoluto da área do pico correspondente ao componente x

Area<sub>PI</sub> - valor absoluto da área do pico correspondente ao padrão interno

#### 3.4.3.3. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

A determinação do TBA permite avaliar a qualidade do pescado, por quantificação do malonaldeído, um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos gordos polinsaturados, formado durante o processo oxidativo da gordura do pescado (NP 3356 , 1990). A rancificação é um problema nos peixes gordos associados principalmente quando acondicionados no frio ou armazenamento a seco. Geralmente, os produtos primários da oxidação de ácidos gordos (hidroperóxidos lipídicos) não têm impacto no *flavour* e são mensurados de acordo com os peróxidos. Por norma, os produtos procedentes da oxidação secundária, derivados da decomposição desses hidroperóxidos lipídicos, originam sabores rançosos e aromas. A taxa de formação de hidroperóxido está correlacionada com a oxidação lipídica em seus estágios iniciais. Compostos como os aldeídos, cetonas são os produtos secundários que se formam à medida que os hidroperóxidos reagem (Dehghani, Regenstein , & Hosseini, 2017).

Os radicais livres do oxigénio, com os seus eletrões não pareados, podem “atacar” e prejudicar, quase todas as moléculas encontradas no organismo (Youngson, 1995). A carne presente no pescado contém uma fonte essencial de proteínas, vitaminas, minerais e lípidos. No entanto, este género

alimentício é muito perecível mais que a carne de frango ou carne de bovino e suíno devido aos aminoácidos livres de bases azotadas e ácidos gordos insaturados. Os ácidos gordos polinsaturados contidos no pescado torna este alimento suscetível à oxidação, levando à formação de peróxidos e metabolitos secundários provenientes destes, nomeadamente aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos podendo ser contabilizados através do índice de TBA (Bertolin, et al., 2009). Os antioxidantes presentes nas macroalgas podem atuar como “conservantes naturais” e impedir a deterioração do produto durante o armazenamento, em particular na forma de ranço devido à oxidação de ácidos gordos insaturados em, por exemplo, produtos alimentícios (Hermund, 2018). Para a determinação do TBA usou-se como método de referencia NP 3356 (1990). Pesaram-se rigorosamente, para tubos de Falcon devidamente identificados, 5 g de cada uma das amostras (em triplicado). Depois, adicionou-se 10,0 mL ( $V_E$ ) de solução A (ácido tricloroacético a 7,5% (m/v), 0,1% de EDTA e 0,1% de galato de propilo) EDTA e homogeneizou-se no vórtex durante 5 minutos, velocidade 4. Seguidamente, centrifugou-se de modo a obter um sobrenadante límpido. Para os tubos de ebulição devidamente identificados, colocou-se 0,1 mL de cada da amostra (volumes  $V_1$ ) mais 5,0 mL de solução A e levou-se ao vórtex VV3 (VWR, Portugal) cerca de 30 segundos, velocidade 5. Depois, adicionou-se 5,0 mL de solução TBA (solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0.02 mol/L) a cada tubo de ebulição, fechou-se os tubos e homogeneizou-se no vórtex VV3 (VWR, Portugal) durante 1 min, velocidade 4. Prontamente, colocaram-se os tubos em banho-maria Labortechnik (Kottermann, Alemanha) em água fervente durante 40 min. No fim, deixaram-se os tubos de ebulição arrefecer à temperatura ambiente e leu-se absorvância no espectrofotómetro Thermo Scientific (Unicam, Portugal) das soluções a  $\lambda=532$  nm com o programa de leitura Insight 2.

Preparou-se uma curva de calibração a partir de soluções padrão de 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP) de concentrações entre  $2 \times 10^{-9}$  e  $1 \times 10^{-8}$  mol/L, que foram tratadas com solução de TBA tal como descrito para as amostras.

O índice de TBA foi expresso em mg de malonaldeído por Kg de amostra, e calculado a partir da seguinte equação 11:

$$\text{ÍNDICE DE TBA} = \frac{M(MA) \times n}{m \times v_1} \times (VE + m \times H) \quad (11)$$

Onde:

**M(MA)**- Massa molar do malonaldeído =72,0636 g/mol

**n** – Quantidade de malonaldeído expressa em ( $\mu$ mol) determinada por interpolação da curva de calibração

**$V_1$** - Volume (mL) da toma colocada em cada tubo

**m**- Massa das amostras utilizadas (g)

$V_E$  – Volume (mL) de solução A usada na extração

H - Teor de Humidade da amostra (%)

#### 3.4.3.4. Determinação do teor de humidade

Para a determinação do teor de água das amostras de peixe, seguiu-se um procedimento adaptado da norma portuguesa (NP 2282 , 1991). Pesou-se rigorosamente, para gobelés previamente tarados, de 1 g de cada amostra (em triplicado) e espalhou-se com uma vareta de vidro para aumentar a área de contacto com a fonte de calor. Os gobelés com as amostras foram colocados a 105 °C durante 24 horas (estufa WTC, Binder, EUA). Após este período, retiraram-se os gobelés da estufa e colocaram-se no exsiccador durante 3 horas até atingir peso constante. O teor de humidade das amostras, expresso em % (m/m), foi calculado pela equação 12:

$$\text{HUMIDADE (\%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_3)} \times 100 \quad (12)$$

Onde:

$m_1$  - massa do gobelé + amostra inicial (g);

$m_2$  - massa do gobelé + amostra seca (g);

$m_3$  - massa do gobelé (g)

### 3.6. Análise Estatística

O delineamento experimental foi realizado com o recurso ao Software SPSS v26 (2018). As amostras tratadas são independentes e com baixo número de réplicas (<30). Os resultados obtidos no estudo de otimização nomeadamente, dos antioxidantes, açúcares totais, compostos fenólicos, TBA, teor de humidade e lípidos totais foram tratados estatisticamente de modo a averiguar diferenças estatisticamente significativas, correlações. Antes de proceder à aplicação do teste é necessário verificar três condições, nomeadamente:

1. As amostras são retiradas de populações independentes (previamente arbitrado);
2. A distribuição normal da variável  $X^4$  (preditora- variável escalar) de acordo com os 6 tipos de películas<sup>5</sup> (resposta- variável ordinal);
3. As variâncias são homogéneas (inicialmente, admitiu-se que o número de observações em cada nível de um dos fatores é previamente fixado).

---

<sup>4</sup> varia de acordo\_com as variáveis utilizadas

<sup>5</sup> varia de acordo\_com as variáveis utilizadas

Para testar se a distribuição é normal efetua-se o teste de *Shapiro-Wilk*, caso o teste primeiro falhe ( $p\text{-value} < 0,05$ ) usa-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov* como alternativa (Teste de Kolmogorov-Smirnov, 2020).

As Hipóteses para os testes de Normalidade são:

**H<sub>0</sub>** - a variável X para as diferentes categorias (extratos, macroalgas e amostras) têm distribuição Normal ( $N(\mu, \sigma^2)$ );

**H<sub>1</sub>** - a variável X para as diferentes categorias (extratos, macroalgas e amostras) não segue uma distribuição Normal ( $N(\mu, \sigma^2)$ );

Quando os pressupostos da segunda condição são cumpridos pode-se aplicar o *ANOVA* para comparação dos 6 tipos de películas quanto a variável X, onde recorre-se ao teste de Levene para a homogeneidade de variâncias e de Tukey para ver as comparações múltiplas (Teste de Tukey, 2020).  
não são homogêneas;

Com base no *ANOVA* analisou-se os efeitos das variáveis independentes e das interações entre elas nas variáveis dependentes, em função do valor do  $p\text{-value}$  ou sig. para um intervalo de confiança de 95%. Mediante a relação do  $p\text{-value}$  e o nível de significância pode-se rejeitar ou aceitar H<sub>0</sub>, isto é:

$p\text{-value} > \alpha \Rightarrow$  não rejeição de H<sub>0</sub> ao nível  $\alpha$ ;

$p\text{-value} < \alpha \Rightarrow$  rejeição de H<sub>0</sub> ao nível  $\alpha$ ;

Sempre que a segunda e a terceira condição não são cumpridas tem de recorrer-se aos testes não paramétricos, particularmente de *Kruskal-Wallis* para averiguar se há diferenças estatisticamente significativas ou não.

Também, se testou se havia correlações entre as variáveis, nomeadamente o TBA e películas (FRAP e ABTS) através do coeficiente de correlação de *Pearson*, que mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. É um índice adimensional com valores situados ente  $-1,0 \leq r \leq 1,0$  que demonstra a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados. Este coeficiente indica que (INF, 2000):

- **r = 1** → Significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis.
- **r = -1** → Significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, ou seja, se uma aumenta, a outra diminui e vice-versa.
- **r = 0** → Significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra. No entanto, pode existir uma outra dependência que seja "não linear". Assim, o resultado  $r=0$  deve ser investigado por outros meios.

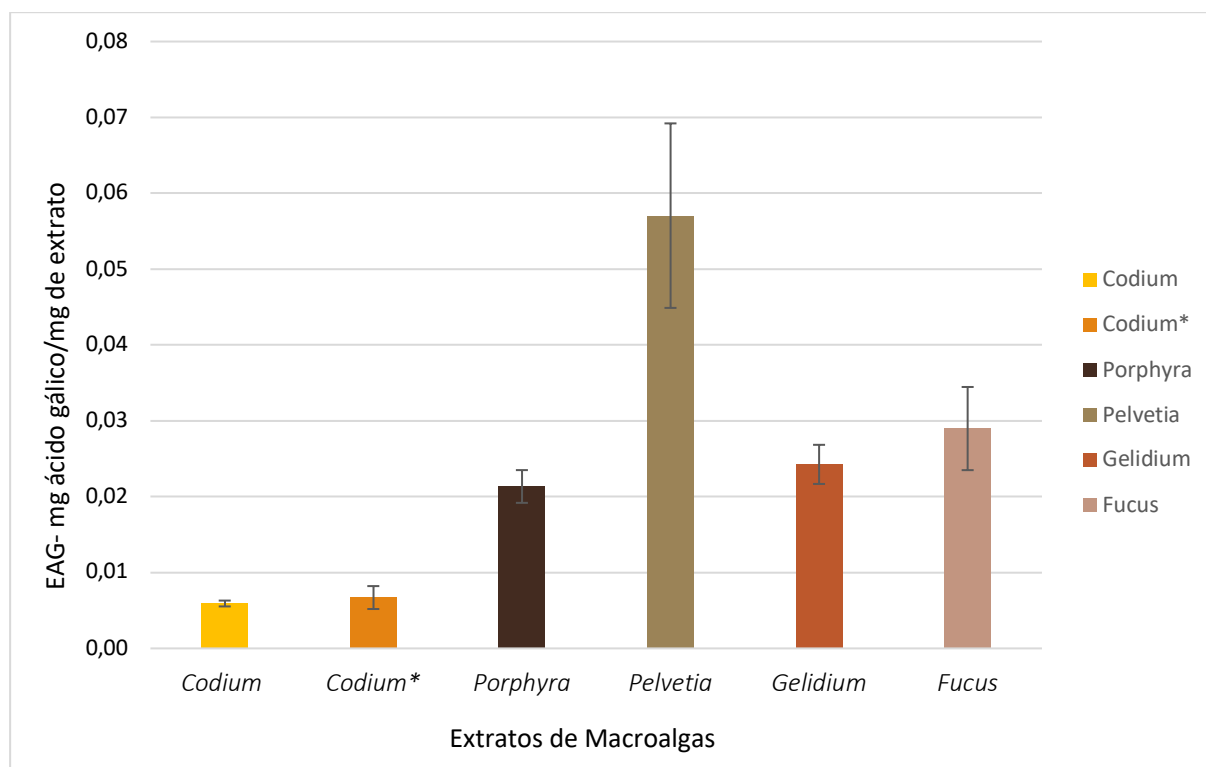
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização dos extratos de macroalgas

Os métodos usados para a determinação dos antioxidantes são colorimétricos onde a alteração da cor indica que houve reação no meio de solução.

#### 4.1.1. Quantificação dos Compostos fenólicos

Para a determinação da quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos de macroalgas foi necessário recorrer a uma reta de calibração (anexo 4), determinando-se assim a quantidade em estudo. Na figura 7 encontram-se representados os valores médios de compostos fenólicos obtidos pelo método direto, sendo esta quantificação expressa em mg EAG/ mg de extrato.



**Figura 7-** Compostos fenólicos dos extratos aquosos de macroalgas, determinados pelo método direto, expressos em EAG (mg ácido gálico/mg de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

Como é possível constar pela figura 7, os extratos que apresentam maior teor em compostos fenólicos são, a *Pelvetia* 0,06 mg EAG/mg de extrato e a *Fucus* com 0,03 mg EAG/mg de extrato.

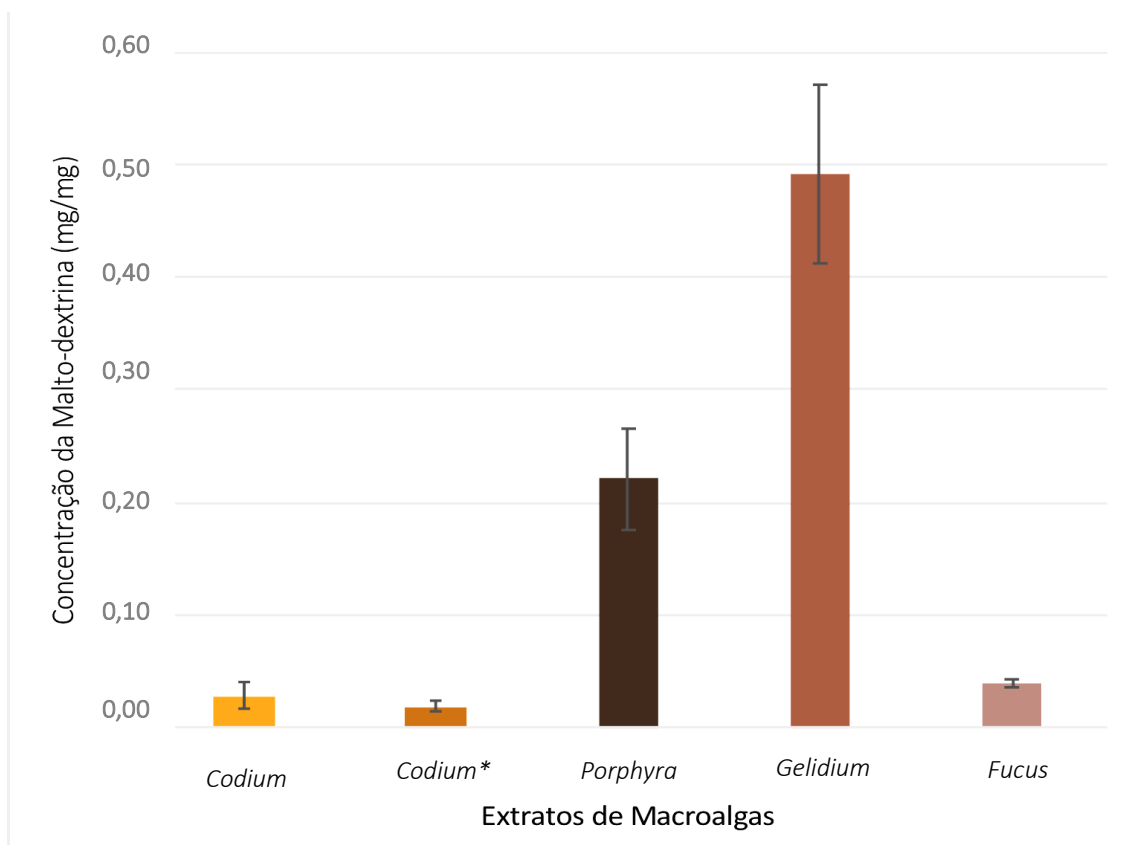
Os resultados obtidos experimentalmente, figura 7, foram de encontro com o expectável visto que, de acordo com Mekini', et al. (2019), as macroalgas com maior teor em compostos fenólicos foram castanhas (*Pelvetia* e *Fucus*) face aos restantes, verdes e vermelhas. O valor obtido da *Pelvetia* (0,06 mg EAG/mg de extrato) encontra-se perto da gama de valores apresentados em trabalhos similares,

particularmente Mekini', et al. . (2019), tendo este extrato aquoso um valor de 0,041 mg EAG/mg extrato, do mesmo modo o valor obtido da *Fucus* (0,03 mg EAG/mg de extrato) encontra-se próximo do valor teórico cerca de 0,09 mg EAG/ mg extrato.

Após efetuado o teste estatístico, verificou-se que o  $p\text{-value} < 0,05$  ( $p\text{-value} = 0,010$ ), logo existem diferenças estatisticamente significativas entre pelo menos duas categorias (extratos) de macroalgas. De acordo com a comparação entre pares de macroalgas, anexo 9, os pares de extratos que tiveram diferenças significativas foram, a *Codium – Pelvetia* com um  $p\text{-value}$  de 0,020 e a *Codium\* – Pelvetia* com um  $p\text{-value}$  de 0,043. Na figura 7, também é possível observar estas diferenças relativamente às médias ao tanto que o extrato com maior média é a *Pelvetia* e o menor é a *Codium*, seguido pela *Codium\**, apresentando assim maior discrepância entre os valores das amostras.

#### **4.1.2. Estudo do conteúdo de açúcares totais**

Como função referencial, usou-se o método fenol-sulfúrico, comumente usado para a determinação quantidades pequenas de açúcares totais. Para a determinação da concentração dos açúcares simples solúveis presentes nos extratos foi necessário elaborar previamente uma reta de calibração (anexo 5), determinando-se assim a quantidade em estudo. Na figura 8 encontram-se os resultados do teor de açúcares totais das amostras analisadas. Os extratos que têm maior teor de açúcares totais são, a *Gelidium* 0,5 mg de maltodextrina/mg de extrato e *Porphyra* com 0,22 mg malto-dextrina/mg de extrato. Embora os extratos de *Gelidium* e *Porphyra* tenham apresentado uma concentração razoável de açúcares, por insuficiência de amostra estes não foram usados nas formulações de revestimentos finais.



**Figura 8-** Concentração dos açúcares solúveis totais dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método fenol- sulfúrico, expressa em equivalentes de malto-dextrina (mg malto-dextrina/mg de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

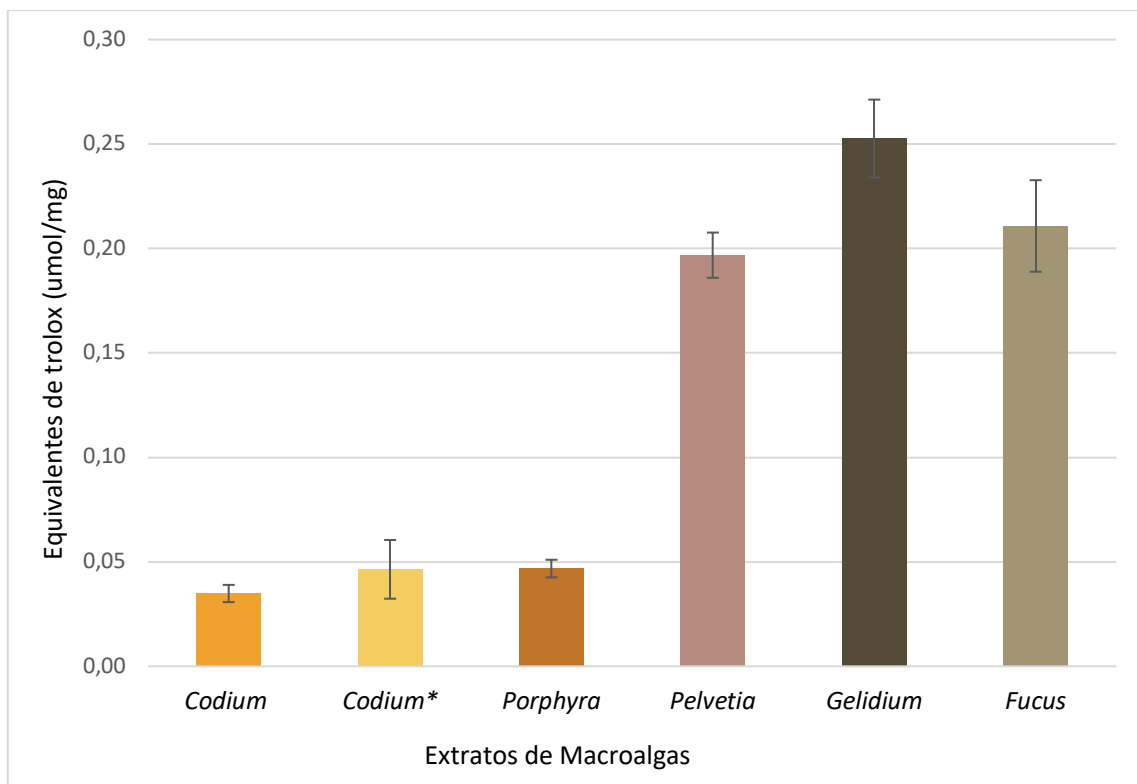
Segundo a figura 8, o extrato com maior teor em açúcares foi a *Gelidium* com 0,5 mg/mg ou 50% da amostra é composta por malto-dextrina, seguido da *Porphyra* com cerca de 0,22 mg/mg ou 22% da amostra. No caso das macroalgas, segundo Souza Abud & de Farias Silva (2019), a concentração de hidratos de carbono presente na biomassa (peso seco) pode variar entre 40% e 85%, consistindo em uma excelente fonte de açúcares, particularmente de glucose e galactose, com potencial para processos fermentativos. Sendo a *Gelidium* um dos géneros citados no estudo como fonte de polissacáridos, ao tanto que o seu valor obtido experimentalmente está dentro da gama de valores acima expostos.

Adicionalmente aplicou-se vários testes estatísticos e verificou-se que neste parâmetro em análise não existem diferenças estatisticamente significativas sendo o *p-value* em todos os casos superior a 0,05. Todavia, é possível observar que existe notoriamente uma diferença no valor médio da *Gelidium* face às restantes, porém não é estatisticamente significativo.

#### 4.1.3. Avaliação da atividade antioxidante

##### 4.1.3.1. DPPH

O método do DPPH atua através de um radical orgânico frequentemente utilizado para a determinação de radicais livres em amostras e a partir do qual é possível obter valores de RSA e de Equivalentes de Trolox ou TEAC. Para a determinação do valor de equivalentes de trolox foi necessário elaborar uma curva de calibração com o reagente padrão (*Trolox*), anexo 1. Na figura 9 é possível observar os valores médios de TEAC pelo procedimento DPPH.



**Figura 9-** Atividade antioxidante dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método de DPPH, expressa em equivalentes de trolox (umol/mg de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

De acordo com a figura 9, os extratos que apresentam maior valor médio de atividade antioxidante são a *Gelidium* com 0,25 umol/mg de extrato e a *Fucus* com 0,21 umol/mg de extrato. De acordo com Paiva et al. (2018) a *Fucus* apresenta um valor médio de 0,076 mg/mL para o DPPH, contudo não é comparável com os dados obtidos para a mesma amostra pelo fato de as unidades não serem passíveis de conversão e por ser um extrato metanólico.

O facto de o extrato *Gelidium* ser higroscópico adquiriu alguma “goma” o que dificultou a dissolução na solução e quando lido no espectrofotómetro pode ter afetado as leituras, embora tenha sido centrifugado e levado a ultrassons, tendo contribuído para elevado valor da absorvância.

O DPPH só pode ser solúvel em solvente orgânico e a interferência da absorvância dos compostos da amostra pode ser um problema para a análise quantitativa. (Kedare & Singh, 2011).

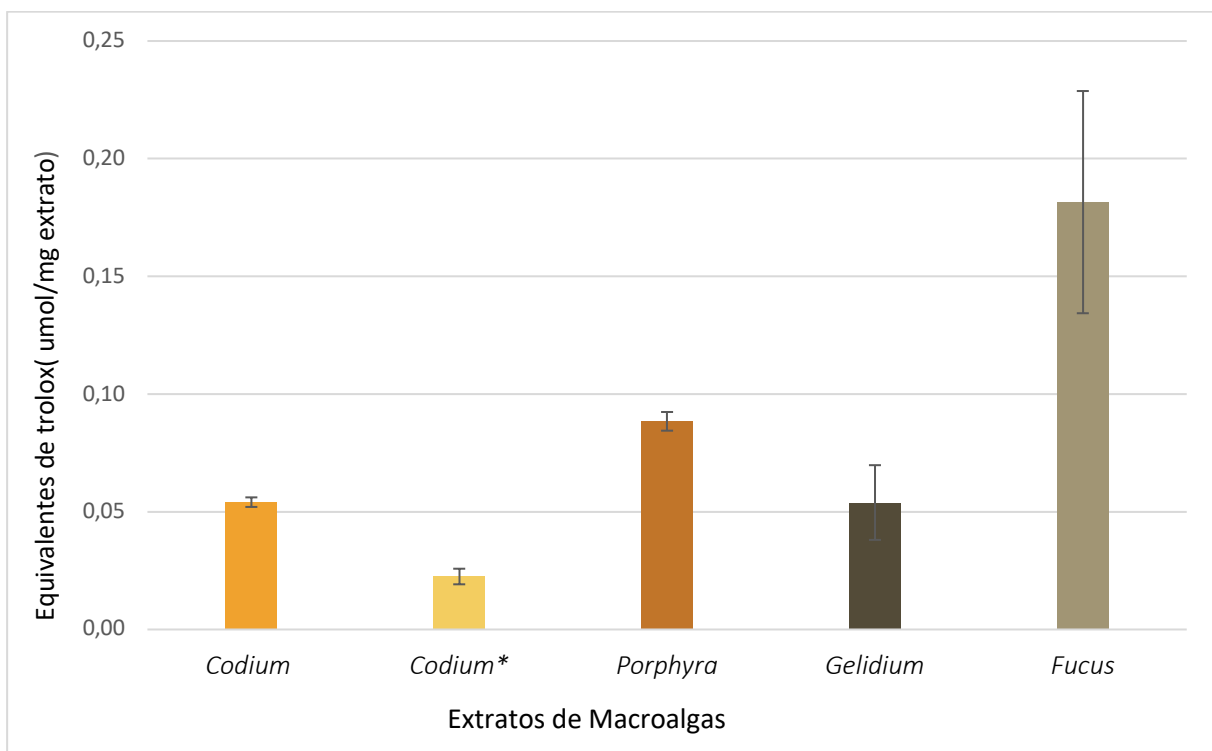
Como o *p-value* é superior a 0,05 (nível de significância), não existem diferenças estatisticamente significativas na variável DPPH para as diferentes categorias de macroalgas (anexo 9). Porém, existem 2 grupos, a *Gelidium-Fucus-Pelvetia* e *Codium-Codium-Porphyra*, que apresentam valores distintos, mas não estatisticamente significativos.

#### 4.1.3.2. FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos através do método FRAP, foi necessário elaborar uma reta de calibração, uma cujo reagente padrão utilizado foi reagente *Trolox*.

A reta de calibração está representada no anexo 2, bem como a equação de cada reta e o seu coeficiente de determinação. A absorvância pode ser medida para testar a quantidade de ferro reduzida e pode ser correlacionada com a quantidade de antioxidantes.

A partir da equação da reta, foi possível determinar a atividade antioxidante dos extratos de analisados. Na figura 10, encontram-se os valores de equivalentes de *trolox* umol/mg de extrato.



**Figura 10-** Atividade antioxidante dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método de FRAP, expressa em equivalentes de *trolox* (umol/mg de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

Na figura 10 os extratos que obtiveram maior valor médio de atividade antioxidante foram o *Fucus* com 0,18 umol/mg de extrato e *Porphyra* com 0,09 umol/mg de extrato. De acordo com Paiva et al. (2018) a *Fucus*, extrato com maior valor médio de antioxidantes, apresenta um valor médio de 0,019 mg/mL para o FRAP, contudo não é comparável com os dados obtidos para a mesma amostra pelo fato de as unidades não serem passíveis de conversão e por ser um extrato metanólico.

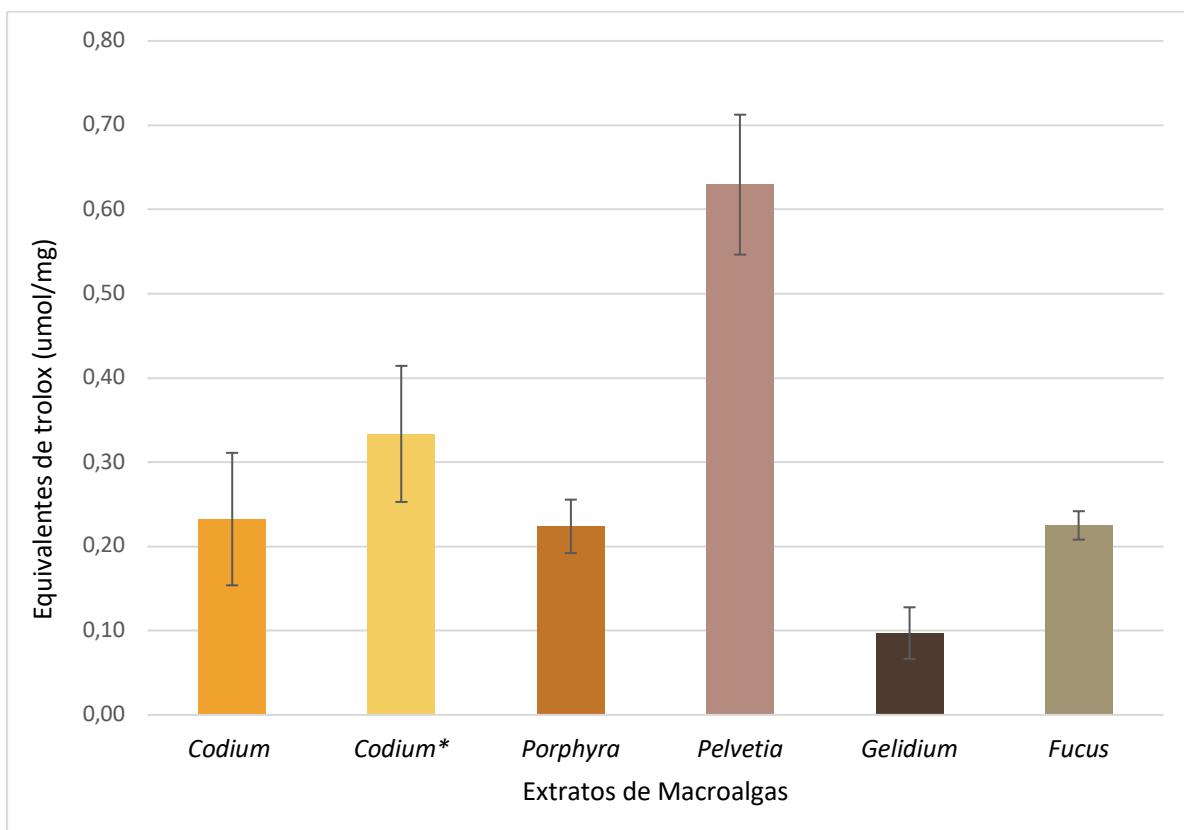
O teste FRAP mede o potencial de redução de um antioxidante que reage com um complexo férrico e é caracterizado por uma cinética rápida (4-6 min), contudo, isso nem sempre acontece. Alguns polifenóis reagem mais lentamente e necessitam tempos de reação mais prolongados para detecção, por exemplo, 30 minutos (Kedare & Singh, 2011). Portanto, parte dos polifenóis presentes nos extratos podem não terem sido contabilizados por não ter aguardado tempo suficiente para ocorrer a reação. Contribuindo assim para interferências nos resultados obtidos.

Através do Teste de comparações múltiplas de Bonferroni (anexo 9), verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas, apenas entre as amostras E<sub>2</sub> e E<sub>6</sub>, mais precisamente entre a *Codium\** e *Fucus*, indo ao encontro dos valores médios da figura 10 onde a amostra *Fucus* apresenta maior média e o menor é da *Codium\**.

#### 4.1.3.3. ABTS

Com base na equação da reta, anexo 3, foi possível determinar a atividade antioxidante dos extratos de analisados através do método ABTS. Na figura 11, encontram-se os valores médios de atividade antioxidante tendo por base o padrão *Trolox*.

O potencial antioxidante dado pelo radical ABTS<sup>•+</sup> é comumente expresso em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de *trolox* por mg de extrato.



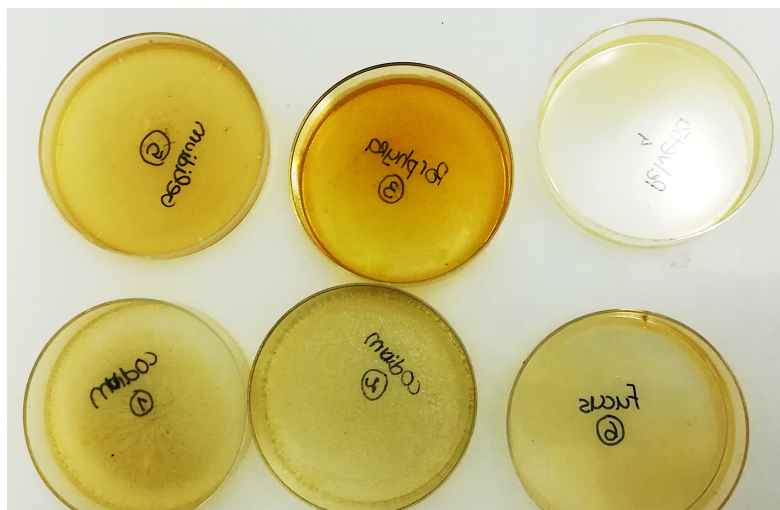
**Figura 11** - Atividade antioxidante dos extratos aquosos de macroalgas, determinada pelo método de ABTS, expressa em equivalentes de *trolox* ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de extrato). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

Assim, conforme descrito na figura 11 os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante são, a *Pelvetia* com  $0,63 \mu\text{mol}/\text{mg}$  extrato e a *Codium\**  $0,33 \mu\text{mol}/\text{mg}$  extrato. O ensaio ABTS utiliza compostos por oxidação do ABTS com persulfato de potássio. Deste modo, o ensaio torna-se demorado visto que leva 12 a 16 horas para ter-se a reação do ABTS com persulfato de potássio o que é uma desvantagem face aos outros métodos. Resumidamente, quanto maior o tempo de exposição ao oxigênio, luz, calor nos extratos maior será o decréscimo da atividade antioxidante, portanto métodos mais céleres são a opção mais viável. Porém, certos compostos bioativos podem não ser solúveis no meio de reação, sendo crucial usar os diferentes métodos para contabilizar os diferentes antioxidantes. Verificou-se através de testes estatísticos (anexo 9), mencionados no ponto 3.6. análise estatística, que não existem diferenças significativas entre os extratos para a metodologia ABTS, sendo o  $p\text{-value} > 0,05$ , isto é,  $p\text{-value} = 0,186$ . Contudo, seguindo a figura 11 é possível ver que o extrato de *Pelvetia* apresenta um valor acima das restantes principalmente da *Gelidium*, todavia não são estatisticamente significativas.

## 4.2. Preparação e caracterização de películas bioativas

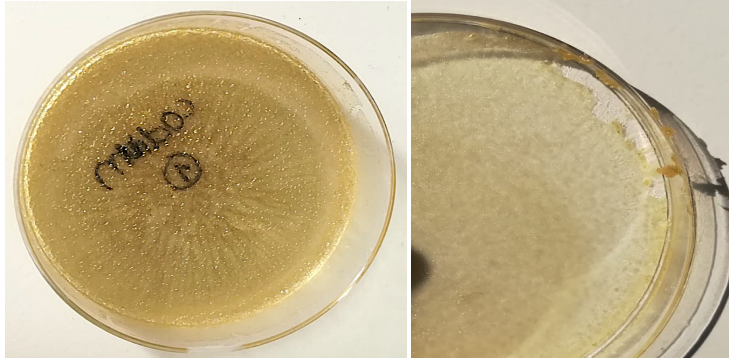
### 4.2.1. Preparação de películas utilizando diretamente os extratos macroalgas

Após a preparação das formulações, descrita na tabela 3, e após secagem em caixa de Petri, verificou-se que nenhuma formou película (Figura 12), apresentando uma aparência viscosa e em alguns casos no centro da amostra e periferias, a concentração em termos de coloração era mais acentuada.



**Figura 12** - Resultados após 48 horas na estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ) das formulações com 1% de extrato (equação 3).

O facto de os extratos não formarem película pode ser devido a: (i) concentração insuficiente de extrato, (ii) baixo teor de polissacáridos nos extratos e/ou (iii) concentração desajustada do plastificante. Para verificar a primeira hipótese produziu-se formulações com maior concentração de extrato (2%). Como é possível observar na figura 12, não houve formação de película ficando a amostra com as características idênticas à figura 13. Este fato foi atribuído uma baixa concentração de polissacáridos nos extratos, que está de acordo com o baixo teor de açúcares totais apresentado da figura 12.

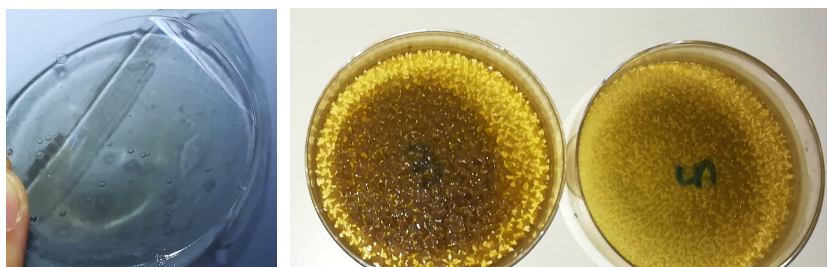


**Figura 13-** Resultados da extração a quente da *Codium tomentosum* (extrato 1 e 2) com uma concentração de extrato de 2%.

Para as formulações das películas comestíveis seguintes optou-se por usar biopolímeros comerciais, alginato e gelatina de peixe, para formar a matriz polimérica. A escolha do alginato fundamentou-se no facto de ser um biopolímero natural sintetizado a partir de algas castanhas ou Filo Phaeophyta e de microrganismos inserindo-se assim no âmbito deste trabalho laboral. Inclusivamente, é um composto já muito usado na indústria alimentar. A gelatina de peixe foi escolhida por se inserir no âmbito da economia circular, na valorização de subprodutos do peixe.

Na figura 14 é possível observar os resultados obtidos com as formulações da tabela 5. Verifica-se que apenas a amostra Y formou uma película, ao contrário das formulações Z e W, apesar de estas serem constituídas por concentrações de extratos mais elevadas (5 e 10%, respetivamente).

Estas ficaram com uma aparência viscosa, e uma pigmentação pouco homogénea onde na zona mais central da caixa de petri apresenta uma concentração maiores em relação à periferia. Em comparação com a figura 13 as amostras Z e W adquiriram maior viscosidade.



**Figura 14-** A amostra Y encontra-se no lado esquerdo, no meio está a amostra W e à direita a amostra Z.  
**Legenda:** Amostra Y- Alginato, Amostra Z- *Codium tomentosum* a 5%, Amostra W- *Codium tomentosum* a 10%.

**Amostra Y-** 1% de alginato (m/m solução) + 30% de glicerol (m/m alginato) + 15 mL H<sub>2</sub>O

Na figura 14, também é possível constatar-se que a formulação inicial que se usou para fazer as películas da tabela 3 está correta, contudo o método de extração dos polissacáridos das macroalgas não foi eficiente, ficando parte destes retidos durante o processo de extração destas.

Posto isto, optou-se por utilizar o alginato e a gelatina de peixe como agentes de formação de películas e revestimentos, e os extratos de algas como fontes de compostos antioxidantes, de forma a produzir películas/revestimentos ativos.

#### 4.2.2. Preparação de películas bioativas à base de alginato e gelatina de peixe

Na tabela 7 estão imagens das películas formadas com e sem extrato de acordo com a formulação indicada nos materiais e métodos. Note-se que a escolha do extrato a incorporar na formulação das películas, foi com base na quantidade de amostra disponível e só depois a atividade antioxidante. Seria de esperar, a escolha dos extratos 3 e 4 para incorporação nas soluções filmogénicas, mas por falta de amostra apenas se caracterizaram e escolheram-se os extratos logo a seguir que apresentam maior atividade antioxidante.

**Tabela 7** - Aparência das películas obtidas nos ensaios finais do delineamento experimental

**Legenda:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub>– gelatina de peixe com extrato 6 (*Fucus spirulis*).



Alg



AlgE<sub>1</sub>



AlgE<sub>6</sub>



Gel



GelE<sub>1</sub>



GelE<sub>6</sub>

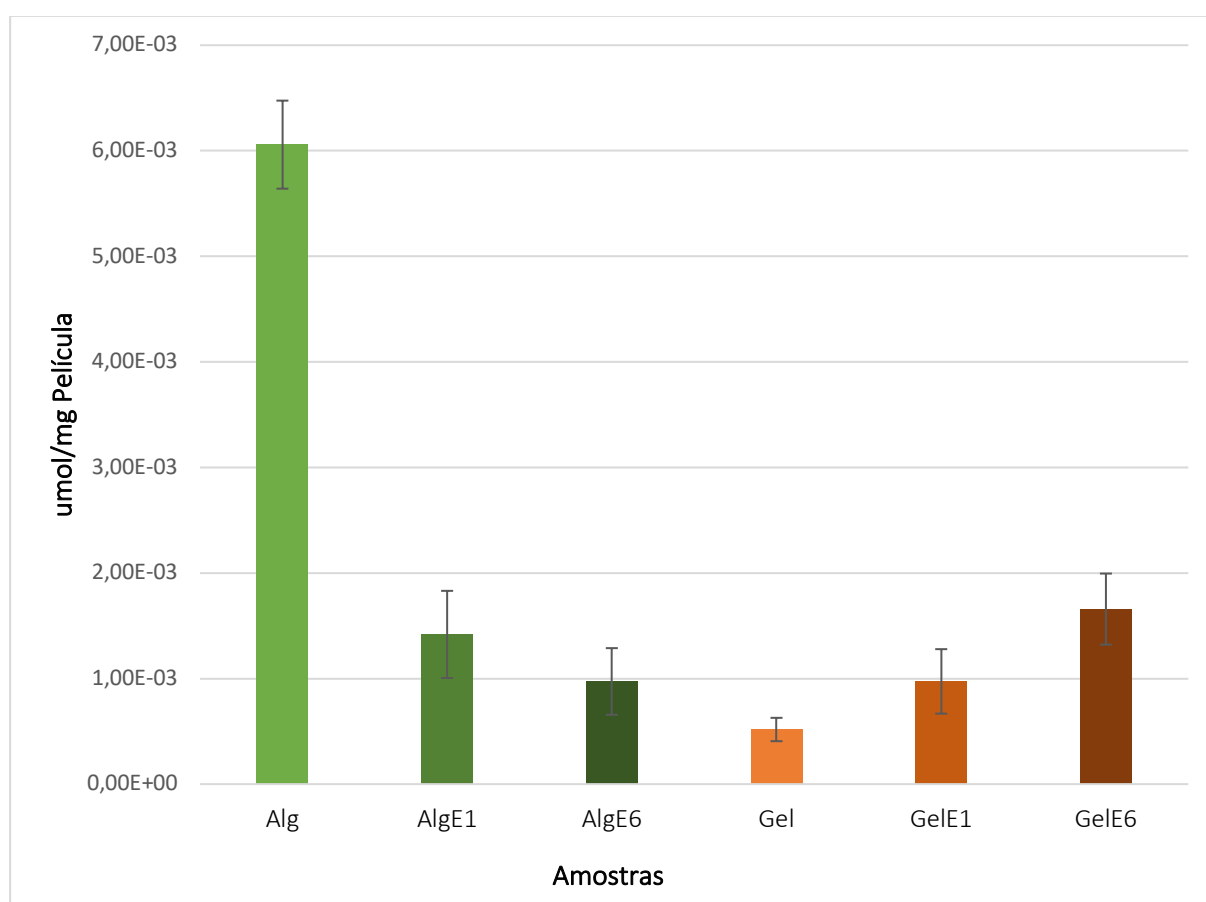
Na tabela 6 tem-se as formulações das respectivas películas e na tabela 7 as imagens correspondentes de cada um. As películas sem extrato são transparentes, enquanto que nas que houve adição de extrato, tanto 1 ou 6, apresentam uma coloração esverdeada devido aos pigmentos extraídos que passam durante a extração das macroalgas. Sendo mais evidente a cor nas películas com extrato 6. Não obstante, as películas com maior resistência são as que têm na sua formulação gelatina de peixe.

#### 4.2.3. Estudo da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante das películas recorreu-se métodos colorimétricos, os mesmos usados para a quantificação da atividade exceto o DPPH.

##### 4.2.3.1. FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante através do FRAP usou-se a reta de calibração (anexo 2) e calculou-se a atividade antioxidante para cada película. Na figura 15 tem-se os valores médios de TEAC obtidos pelo método FRAP.



**Figura 15** - Atividade antioxidante das películas com extratos de macroalgas, determinada pelo método de FRAP, expressa em equivalentes de *trolox* (umol/mg de película). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

As películas que aduzem maior atividade antioxidante, pela determinação do poder de redução do ião ferro, são, Alg com 0,006 umol/mg de película e GelE<sub>6</sub> com 0,002 umol/mg de película. Atente-se que é expectável que a atividade antioxidante das películas seja inferior aos valores dos extratos, devido ao facto de nas películas as moléculas estarem mais ligadas e não estão tão livres para reagir com o reagente.

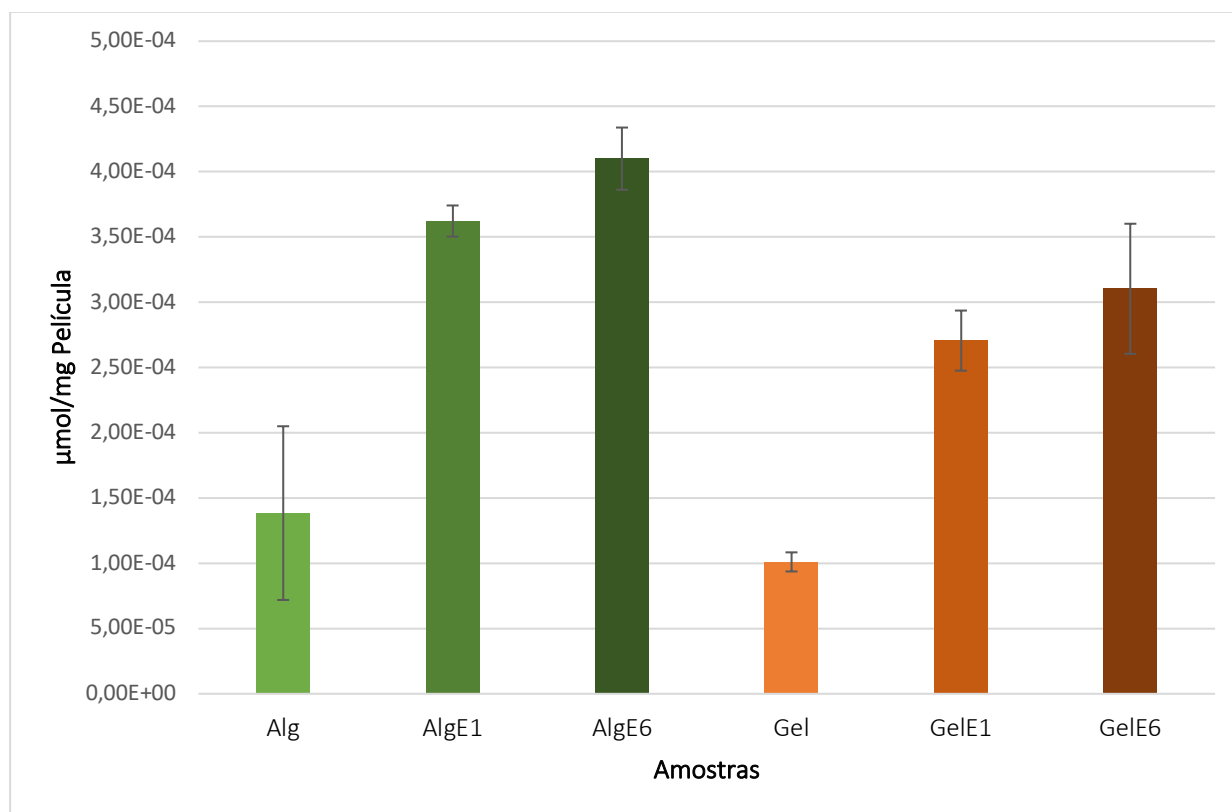
Segundo a metodologia do FRAP as películas de alginato puro (Alg) foram as que obtiveram maior atividade antioxidante, relativamente a todas as amostras e inclusive as que têm incorporados extratos *Fucus* e *Codium*. Este facto pode dever-se a uma inibição da reação dos extratos com o reagente FRAP por parte do alginato. Segundo o estudo Jiao e Yu (2011), os fucanos presentes na *Fucus vesiculosus* (extrato 6) contêm um poder redutor/antioxidante férrico o que devia ter contribuído para o aumento dos valores da atividade antioxidante deste extrato e isso não se verificou.

As propriedades antioxidantes das carrageninas e ulvanas também apareceram relacionadas ao conteúdo de sulfato. No último estudo, os derivados de ulvanas com alto teor de sulfato mostraram atividades antioxidantes aprimoradas (Jiao, Yu, Zhang, & Ewar, 2011).

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey (anexo 9), observa-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre a película Alg e as restantes, assim como entre Gel e GelE<sub>6</sub>. Também é possível constatar na figura 15 que as películas de Alg detêm maior valor médio de antioxidantes comparativamente a todas as amostras, tal demonstrou o teste de Tukey, e dentro do mesmo grupo de amostras, a Gel e a GelE<sub>6</sub> têm maiores diferenças significativas.

#### 4.2.3.2. ABTS

Na figura 16 estão os valores médios da atividade antioxidante das películas pelo método ABTS.



**Figura 16** - Atividade antioxidante das películas de macroalgas, determinada pelo método de ABTS, expressa em equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de película). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

Através desta metodologia há estabilização do radical ABTS por um antioxidante e a formação persulfato de potássio. As películas que demonstraram maior atividade antioxidante são as seguintes, AlgE<sub>6</sub> 0,0004  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de película e AlgE<sub>1</sub> 0,0003  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de película. As ulvanas estão associadas às macroalgas verdes e no contexto deste trabalho laboral ao extrato *Codium* ou E<sub>1</sub> apenas as películas pela metodologia ABTS foram contabilizados e obtiveram um maior valor em oposição ao FRAP, o que leva a concluir que os antioxidantes presentes nos dois extratos escolhidos para incorporar as películas reagem melhor com o radical ABTS. A película com gelatina de peixe (Gel) teve um teor menor de atividade antioxidante em relação às amostras que contêm extrato (GelE<sub>1</sub> e GelE<sub>6</sub>) incorporado, o que é provável porque os extratos acrescentam valor antioxidante à película.

Através do Teste de comparações múltiplas de Bonferroni (anexo 9), verificou-se existirem diferenças estatisticamente significativas, entre as amostras Gel e AlgE<sub>6</sub>, e entre Alg e AlgE<sub>6</sub>. Na figura 17, as películas com maior valor médio é AlgE<sub>6</sub> comparativamente às restantes, sendo a diferença

estaticamente significa entre esta amostra e a Gel, no mesmo grupo de películas (alginato) existe diferenças significativas entre as películas de Alg e AlgE<sub>6</sub>.

#### 4.2.4. Cor

A cor é um dos primeiros e principais critérios para a aceitação ou rejeição de um género alimentício. Nas tabelas descritas de seguida estão as soluções filmogénicas optadas. Na tabela 8 estão os três parâmetros de cor: L\*, a\* e b\*. Na tabela 8 estão os dados alusivos ao C\*, h°.

**Tabela 8-** Parâmetros medidos pelo colorímetro (CIELAB) – L\*, a\* e b\* (médias).

**Legenda:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 (*Fucus spirulis*).

	L*	a*	b*
Alg	93,56+/- 0,26	-0,67+/-0,02	5,25+/-0,10
AlgE <sub>1</sub>	92,75+/-0,65	-1,16+/- 0,08	8,05+/- 1,24
AlgE <sub>6</sub>	91,88+/- 0,47	-0,94+/- 0,02	9,71+/- 1,22
Gel	93,77+/- 0,10	-0,84+/- 0,04	4,83+/- 0,18
GelE <sub>1</sub>	88,17+/- 2,44	-2,76+/- 0,42	19,86+/- 5,81
GelE <sub>6</sub>	85,22+/- 0,28	-3,39+/- 0,14	29,61+/- 1,14

Como é possível observar para o parâmetro L\* os valores de todos os extratos são elevados, próximos de 100, logo no que respeita à luminosidade esta aproxima-se do branco. As películas sem extrato (brancos) apresentam valores de a\* superiores às que têm extrato, e estão associadas a colorações verdes/vermelhas neste caso verdes porque têm valores negativos.

Relativamente ao parâmetro b\* as amostras sem extrato têm valores mais baixos que as com extrato e estão na gama dos amarelos/azuis e neste contexto em estudo, tem uma maior ligação com a cor amarela por ter valores positivos. Em baixo os parâmetros a\* e b\* serão novamente debatidos porque não são variáveis independentes e correlacionam-se com outros parâmetros.

**Tabela 9 -** Parâmetros CIELCH - Cromo C\* e h°.

**Legenda:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 (*Fucus spirulis*).

	Cromaticidade	
	C* (Croma ou saturação)	h° (Tonalidade Hue)
Alg	5,29	238,11
AlgE <sub>1</sub>	8,13	235,89
AlgE <sub>6</sub>	9,75	235,85
Gel	4,90	238,11
GelE <sub>1</sub>	20,05	235,89
GelE <sub>6</sub>	29,80	235,8

O croma indica se a amostra é mais ou menos saturada (distância da origem às abcissas) e nesta conjuntura, tabela 9, as películas com alginatos são as menos baças ou saturadas enquanto que as com gelatina de peixe apresentam maior saturação/baças.

Concomitantemente, a adição de extrato à formulação base, aumenta o valor croma principalmente as que contêm o extrato 6 (maior croma maior saturação).

A tonalidade de *Hue* é um parâmetro tridimensional que dita o ângulo entre a\* e b\* e varia de 0° a 360°. No caso em estudo os valores situam-se no terceiro quadrante com valores próximos de 240 graus onde os tons variam entre os esverdeados e azulados.

#### 4.2.5. Espessura

Na tabela 10 encontra-se os valores das espessuras das películas em mm.

**Tabela 10** - Espessuras das películas (mm).

**Legenda:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub>– gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

	Espessura (mm)
Alg	0,02
AlgE <sub>1</sub>	0,03
AlgE <sub>6</sub>	0,03
Gel	0,11

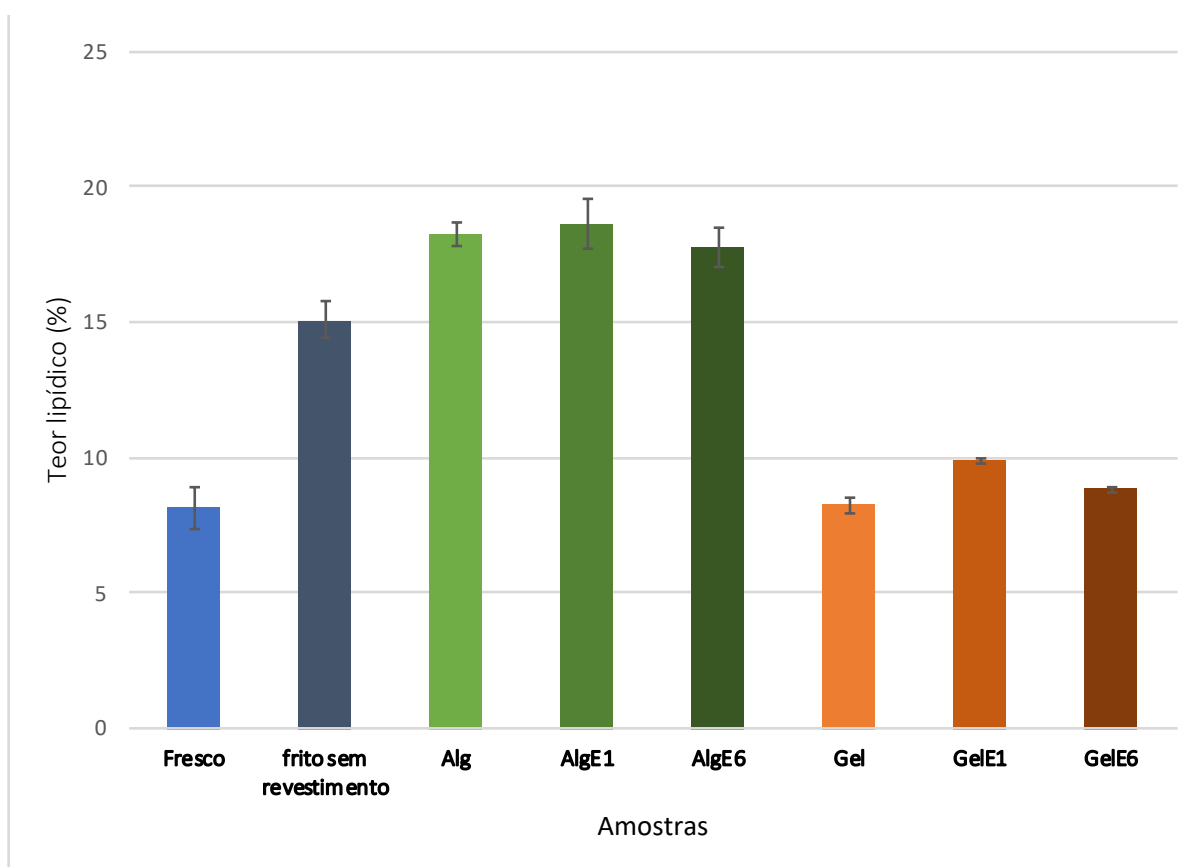
GelE <sub>1</sub>	0,12
GelE <sub>6</sub>	0,19

A tabela 10 apresenta as diferentes espessuras das películas, e os que apresentam maior espessura são os que na sua formulação têm gelatina de peixe. A película com maior espessura é de gelatina de peixe com adição do extrato 6, com cerca de 0,19 mm. Também é importante referir que a adição de extrato nas películas aumenta substancialmente o valor da espessura das mesmas.

### 4.3. Caracterização dos filetes de cavala antes e após fritura

#### 4.3.1. Determinação do teor de lípidos totais

Na figura 17 estão descritos os valores obtidos do teor lipídico (%) das diferentes amostras. Neste gráfico estão diferenciados três grupos com uma coloração correspondente, a verde estão as amostras que contêm solução de Alginato, cor de laranja as amostras que contêm Gelatina de peixe e a azul escuro a amostra padrão (que não foi frita) e a azul claro a amostra de comparação, sem revestimento.



**Figura 17** - Teor lipídico das amostras, determinado pelo método de *Folch*, expresso em percentagem. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

De acordo com a figura 17, é possível inferir-se que as amostras com as soluções de Alg (com e sem extrato) foram as que obtiveram maior percentagem de teor lipídico acima dos 15%, sendo até superior à amostra de peixe frito sem revestimento. Este resultado indica que as soluções de alginato promoveram a absorção de óleo durante a fritura. Pelo contrário, as amostras com Gel foram as que obtiveram menor percentagem de teor lípido face às de Alg e as fritas, logo foram as que absorveram menos óleo durante a fritura, abaixo dos 10%. As amostras de Gel (com e sem extrato) obtiveram valores próximos da amostra padrão, peixe fresco, portanto houve uma absorção quase vestigial de óleo com a presença deste revestimento, todavia entre as três amostras de Alginato, a AlgE6 teve um valor ligeiramente inferior às duas restantes.

Em síntese, os revestimentos que obtiveram melhores resultados para a inibição ou diminuição da absorção de óleo durante a fritura foram os de origem proteica. A incorporação dos extratos E<sub>1</sub> e E<sub>6</sub> não surtiu o efeito pretendido ao tanto que tiveram valores de absorção de óleo superiores aos restantes.

Como o *p-value*>0,05, não existem diferenças estaticamente significativas na variável lípidos para as diferentes categorias de amostras (anexo 10). Contudo observa-se que o grupo de amostras com gelatina de peixe são as que houve menor absorção média de gordura.

#### **4.3.2. Caracterização do perfil de ácidos gordos dos filetes de peixe**

Na tabela 11 apresentam-se os teores (ug/mg) de ácidos gordos presentes nas amostras, em que C20:5(n3) corresponde ao EPA, C22:6(n3) ao DHA, ácidos gordos insaturados do tipo ómega 3. Ainda na tabela 11 a amarelo está assinalado os ácidos gordos que aumentaram drasticamente durante a fritura, e a verde os ácidos gordos essenciais (EPA, DHA).

As gorduras mais indispensáveis são aquelas que o corpo não consegue sintetizar e, portanto, advêm da alimentação. Os ácidos gordos estão envolvidos em vários processos biológicos e produzem muitos compostos quando são metabolizados (Kapalka, 2010).

A dieta Ocidental geralmente inclui ácidos gordos omega-6 em grandes quantidades, em alimentos como alguns exemplares da família leguminosas, óleos vegetais entre outros são ricos em lípidos do grupo omega-6. No entanto, os ácidos gordos omega-3, presentes principalmente em peixes de água fria, não são tão comumente consumidos e, conseqüentemente, a suplementação com ómega-3 é recomendada (Kapalka, 2010).

**Tabela 11** - Quantidade média (ug/mg) com os respectivos desvios padrão/dp (+/-) dos ácidos gordos presentes em cada amostra, obtidos por Cromatografia Gasosa.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel- gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub>- gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

Ácido Gorduroso	cavala crua ou fresca		cavala - frita sem revestimento		ALG		ALG-E1		ALG-E6		Gel		Gel-E1		Gel-E6	
	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp	MÉDIA	dp
C14	1,69	+ 0,20	1,24	+ 0,37	1,73	+ 0,18	2,68	+ 0,40	1,46	+ 0,11	1,21	+ 0,20	1,22	+ 0,10	1,27	+ 0,06
C15	0,07	+ 0,02	0,05	+ 0,02	0,06	+ 0,01	0,10	+ 0,01	0,05	+ 0,01	0,05	+ 0,01	0,04	+ 0,00	0,05	+ 0,01
C15:1 n5	0,19	+ 0,01	0,18	+ 0,05	0,23	+ 0,02	0,32	+ 0,05	0,22	+ 0,02	0,21	+ 0,04	0,17	+ 0,01	0,20	+ 0,02
C16	5,62	+ 0,61	11,86	+ 1,49	15,83	+ 0,78	18,62	+ 1,13	13,89	+ 1,14	8,05	+ 0,99	8,81	+ 0,43	8,29	+ 0,55
C16:1 n7	1,42	+ 0,45	1,38	+ 0,35	1,71	+ 0,06	2,75	+ 0,28	1,49	+ 0,27	1,20	+ 0,13	0,75	+ 0,08	0,99	+ 0,03
C16:2 n4	0,05	+ 0,01	0,06	+ 0,06	0,08	+ 0,08	0,12	+ 0,09	0,08	+ 0,06	0,06	+ 0,06	0,01	+ 0,01	0,08	+ 0,03
C18	1,80	+ 0,10	4,49	+ 0,65	4,88	+ 0,04	5,82	+ 0,33	4,96	+ 0,35	2,72	+ 0,29	3,30	+ 0,24	3,17	+ 0,28
C18:1 n9	1,10	+ 0,68	29,42	+ 1,75	30,08	+ 2,45	28,85	+ 0,06	33,10	+ 2,90	11,96	+ 1,10	15,93	+ 1,29	13,87	+ 1,28
C18:1 n7	0,84	+ 0,30														
C18:2 n6	0,37	+ 0,03	44,42	+ 1,24	41,53	+ 1,82	37,69	+ 2,85	49,25	+ 4,23	12,61	+ 1,36	24,10	+ 1,74	20,75	+ 2,37
C18:3 n3	0,20	+ 0,04	0,20	+ 0,05	0,29	+ 0,03	0,38	+ 0,06	0,26	+ 0,04	0,11	+ 0,01	0,15	+ 0,06	0,14	+ 0,02
C18:4 n3	0,09	+ 0,03	0,18	+ 0,03	0,19	+ 0,00	0,24	+ 0,01	0,20	+ 0,02	0,12	+ 0,02	0,14	+ 0,04	0,14	+ 0,02
C20:1 n11	0,46	+ 0,11	0,22	+ 0,08	0,31	+ 0,05			0,26	+ 0,02					0,14	+ 0,01
C20:1 n9	0,33	+ 0,05	0,65	+ 0,17	1,07	+ 0,04			0,90	+ 0,09					0,77	+ 0,11
C20:1 (n11 + n9)							1,02	+ 0,63			1,03	+ 0,34	1,06	+ 0,11		
C20:2 n6			0,09	+ 0,03	0,10	+ 0,00	0,18	+ 0,05	0,09	+ 0,01	0,12	+ 0,02	0,09	+ 0,01	0,11	+ 0,01

C20:4 n6	0,21	+ 0,04	0,29	+ 0,09	0,33	+ 0,04	0,54	+ 0,04	0,29	+ 0,04	0,31	+ 0,08	0,30	+ 0,04	0,24	+ 0,00
C22	0,05	+ 0,04	0,24	+ 0,04	0,21	+ 0,02	0,25	+ 0,02	0,29	+ 0,07	0,11	+ 0,03	0,19	+ 0,07	0,14	+ 0,07
C22:1	0,20	+ 0,18	0,21	+ 0,07	0,33	+ 0,02	0,43	+ 0,06	0,36	+ 0,04	0,25	+ 0,06	0,44	+ 0,16	0,41	+ 0,09
C20:5 n3	2,24	+ 0,20	2,26	+ 0,65	2,94	+ 0,20	4,87	+ 0,64	2,49	+ 0,15	1,96	+ 0,35	1,77	+ 0,24	1,83	+ 0,18
C22:5 n3	0,17	+ 0,02	0,20	+ 0,06	0,24	+ 0,02	0,43	+ 0,04	0,23	+ 0,02	0,17	+ 0,04	0,17	+ 0,03	0,17	+ 0,02
C22:6 n3	2,91	+ 0,28	3,18	+ 0,72	3,96	+ 0,07	5,62	+ 0,42	4,23	+ 0,31	3,39	+ 0,53	3,46	+ 0,49	3,31	+ 0,47

Para averiguar se os revestimentos tiveram influência nos ácidos gordos durante o processo de fritura, equipara-se os resultados da cavala frita sem revestimento com as amostras que o têm. Os ácidos gordos C18:1(n9) da cavala crua ou fresca e C18:2(n6) frita sem revestimento, aumentaram drasticamente devido à presença do óleo de fritura, visto que o C18:1(n9) corresponde ao ácido oleico e C18:2(n6) ao ácido linoleico, da família ómega-6, ambos naturalmente presentes em sementes de colza e girassol (composição do óleo).

A amostra que teve menor aumento do ácido gordo C18:1(n9) foi o Gel com 11, 96 ug/mg e a que teve maior foi o AlgE<sub>6</sub> com 33,10 ug/mg sendo superior à amostra sem revestimento com cerca de 29,42 ug/mg, levando a crer que a amostra ALgE<sub>6</sub> foi a amostra que mais absorveu o óleo de fritura. Para o C18:2(n6) igualmente como no resultado anterior foram as amostras com gelatina de peixe foram as que obtiveram menor valor para este ácido gordo, isto deve-se às propriedades da película que diminui a absorção do óleo durante a fritura, embora tenha havido alguma absorção (comparativamente ao fresco) todavia foi inferior às restantes amostras. No caso do C18:4(n3) apenas as amostras de alginato tiveram maiores aumentos do valor deste ácido esteárico aquando as amostras de gelatina de peixe foram as que obtiveram menores valores.

No EPA os valores aumentaram ligeiramente do frito para as amostras com revestimento tendo obtido valores mais elevados nas amostras de Alginato, os valores para as amostras com gelatina de peixe foram inferiores. Levando-se a presumir que houve menos percas de EPA durante a fritura para os revestimentos com gelatina de peixe. No DHA o aumento foi maior, comparando com a amostra frita sem revestimento, nas amostras com alginato podendo ser devido à presença de extratos ou óleo proveniente do processo de fritura. Sendo o valor mais elevado, no caso das amostras com revestimento, para a amostra AlgE<sub>6</sub> 5,62 ug/mg e 3,31 ug/mg no caso GelE<sub>6</sub>.

Cada molécula de um ácido gordo contém numa extremidade (alfa) um grupo carboxilo (COOH) e na outra (ómega) um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) não funcional. A classificação destes compostos é feita de acordo com o comprimento da cadeia carbonada, o número, a posição e a configuração das duplas ligações. Subsistem duas nomenclaturas diferentes para definir os ácidos gordos, contudo, é habitual dar prioridade à localização da ligação dupla mais próxima do grupo terminal metilo (Ipma, ácidos gordos, 2019).

Na tabela 12 constam os dados tratados a partir da tabela 11, onde pode observar-se a quantidade de ácidos gordos saturados, insaturados e polinsaturados presentes nas diferentes amostras.

**Tabela 12** – Quantidade (ug/mg) de ácidos gordos presentes em cada amostra, obtidos do cromatograma, a sombreado estão os maiores valores obtidos experimentalmente.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlGE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlGE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus Spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus Spirulis*).

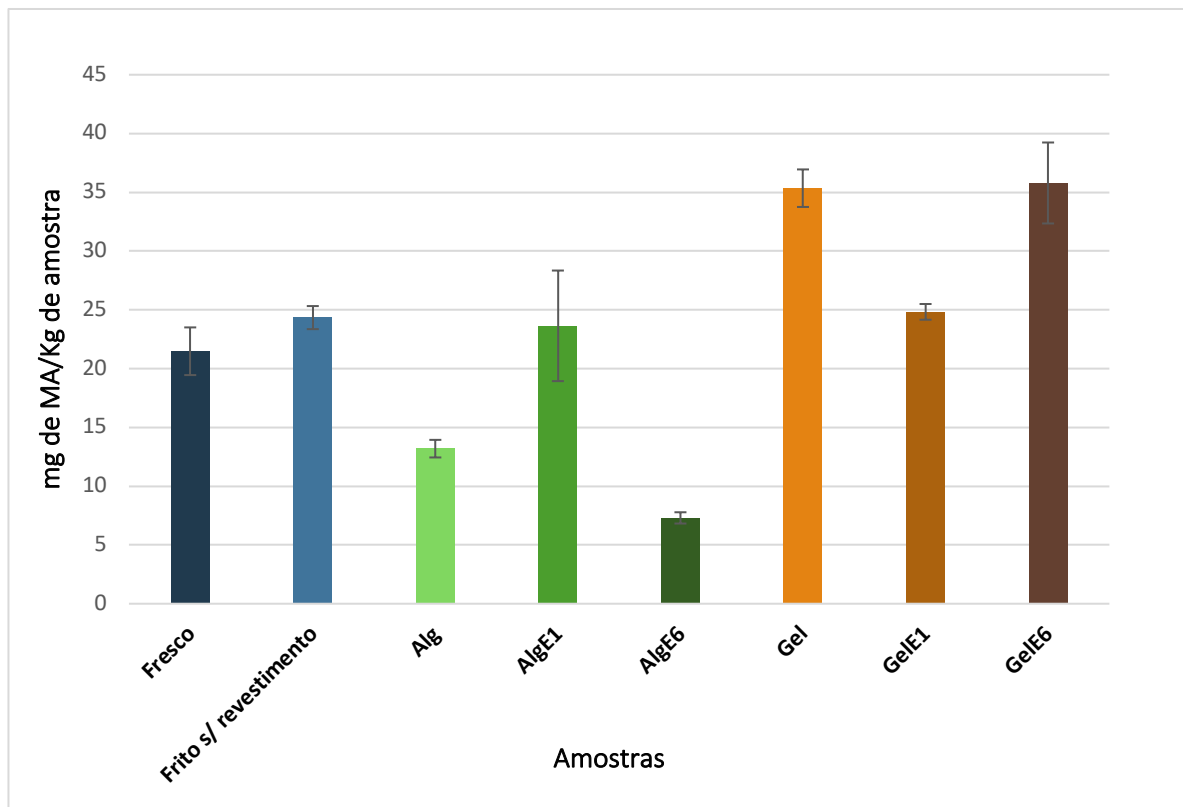
	Fresco	Frito sem revestimento	ALG	ALGE <sub>1</sub>	ALGE <sub>6</sub>	Gel	GelE <sub>1</sub>	GelE <sub>6</sub>
<b>Saturados</b>	9,23	17,88	22,70	27,47	20,65	12,14	13,55	12,92
<b>Monoinsaturados</b>	4,56	32,06	33,72	33,38	36,33	14,66	18,36	16,38
<b>Polinsaturados</b>	6,26	50,88	49,67	50,06	57,13	18,85	30,20	26,78

As amostras que têm o revestimento de alginato foram as que tiveram maiores valores de ácidos gordos tanto saturados como insaturados ou polinsaturados, sendo superiores aos das amostras frita sem revestimento e gelatina de peixe. O facto de haver um valor elevado, cerca de 36,33 ug/mg, de ácidos gordos insaturados deve-se à presença do óleo que durante a fritura é absorção pela matriz do peixe e posteriormente contabilizado na CG, nomeadamente, o ácido oleico(C18:1(n9)) e linoleico(C18:2(n6)). Os valores menores de amostras com gelatina de peixe podem dever-se ao facto de o C18:4(n3) ou ALA ter pouca gordura polinsaturada.

Não obstante, os ácidos gordos polinsaturados (mais de uma ligação dupla) foram os que tiveram o maior contabilizado, 57,13 ug/mg, que pode ter ocorrido porque a incorporação do extrato puro do alginato e do alginato com o extrato 6 terem na sua constituição ácidos gordos polinsaturados aumenta assim o valor drasticamente em relação às outras amostras.

#### 4.3.3. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Na figura 18 encontram-se o índice médio de ácido tiobarbitúrico das amostras em MA ou malonaldeído por Kg de amostra.



**Figura 18** - Índice médio de ácido tiobarbitúrico das amostras, determinado através do TBA expresso em mg de malonaldeído por Kg de amostra com os respectivos desvios padrão presentes nas amostras. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

De acordo com a figura 18, o grupo de amostras que contém Gelatina de peixe comparativamente às de Alginato, são as amostras que manifestam maiores valores de mg MA/kg de amostra, ou seja, maior decomposição dos hidroperóxidos e oxidação lipídica. O comportamento dos extratos foi diferente consoante a matriz em que foi aplicado, ou seja, nas amostras de alginato teve valores mais baixos face às de gelatina de peixe. Tendo a amostra GelE<sub>6</sub> (gelatina de peixe com extrato 6) o maior valor médio cerca de 35,8 mg MA/Kg de amostra e o AlgE<sub>6</sub> (alginato com extrato 6) o menor com 7,3 mg de MA/Kg de amostra.

Mediante a revisão bibliográfica, as amostras com maior atividade antioxidante deveriam ter um menor índice de TBA. Porém, verificou-se que a amostra AlgE<sub>6</sub> (alginato com extrato 6) houve maior atividade antioxidante refletindo-se assim em menores índices de TBA, indo assim ao encontro do expectável. Pelo facto de a gelatina de peixe ser de proveniência proteica pode ter influenciado os

resultados do TBA, porque pode-se ter avaliado a degradação do revestimento conjuntamente à da matriz do peixe.

O limite máximo de TBA para um peixe em condições ótimas para o consumo, varia entre 7- 8  $\mu\text{g MA/g}$  ou 8 mg MA/Kg (Kirschnik & Macedo-Viegas, 2009), no caso em estudo amostra AlgE<sub>6</sub> (alginato com extrato 6) foi a que obteve menor valor face às restantes, cerca de 7,3 mg MA/g. Concluindo-se assim que se encontra dentro da gama de valores ótimos para consumo.

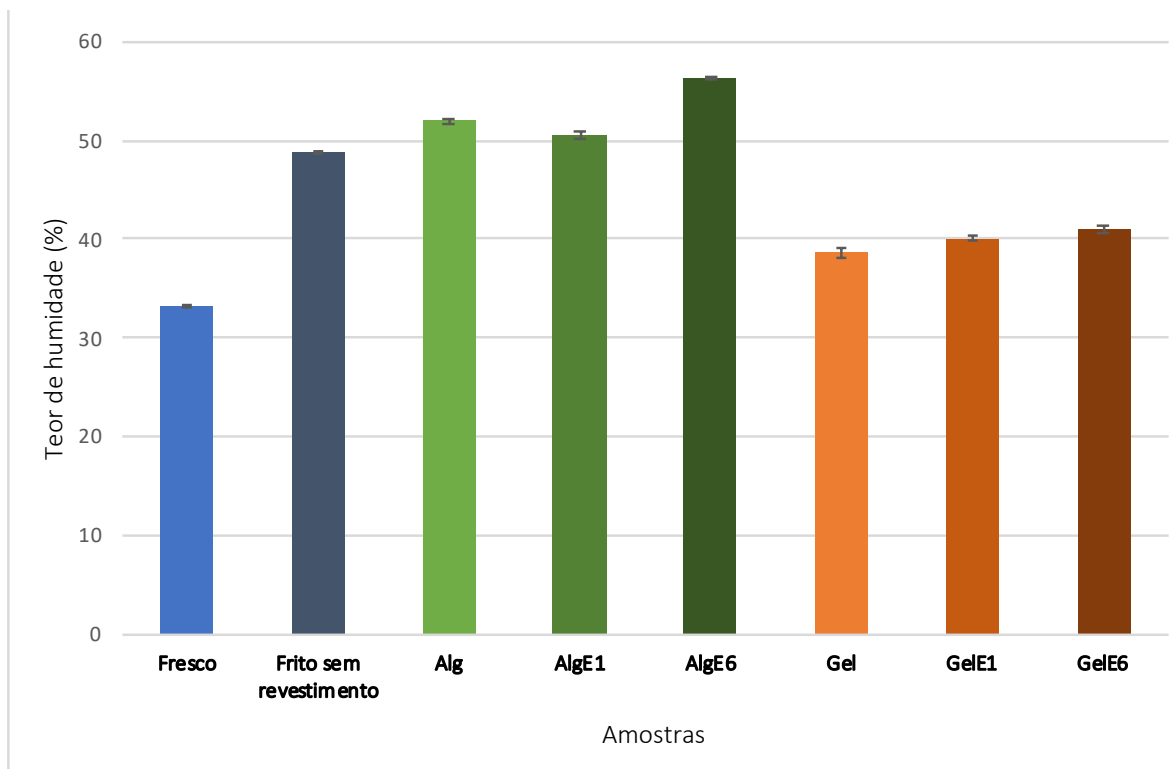
De acordo com os resultados obtidos, anexo 10, existem diferenças estatisticamente significativas entre os pares, AlgE<sub>6</sub> (alginato com extrato 6) e todas as amostras excetuando as amostras Alginato (com e sem extrato) e o Fresco. Do qual é importante referir que o valor da diferença entre o par AlgE<sub>6</sub> (alginato com extrato 6) e o frito sem revestimento tem um *p-value* é 0,019, porque é a amostra ao qual não foi incorporado na sua matriz um revestimento e a amostra que teve maior teor em antioxidantes. Conjuntamente verificou-se que no caso da GelE<sub>1</sub> e AlgE<sub>6</sub> que a incorporação do extrato teve influência nas médias obtidas de TBA, ao tanto que as amostras de alginato a que obteve menor índice foi a AlgE<sub>6</sub> e nas amostras de gelatina de peixe foi a GelE<sub>1</sub>.

Também houve diferenças estatisticamente significativas entre o Fresco e Gel, Fresco e GelE<sub>6</sub> (gelatina de peixe com o extrato 6), bem como Alg(alginato) com a GelE<sub>1</sub>(gelatina de peixe com o extrato 1), GelE<sub>6</sub>(gelatina de peixe com o extrato 6) e Gel (gelatina de peixe), e ainda AlgE<sub>1</sub> (alginato com extrato 1) -Gel e AlgE<sub>1</sub>-GelE<sub>6</sub>.

De acordo com a revisão bibliográfica os antioxidantes presentes nas macroalgas atuam como “conservantes naturais” e podem impedir a deterioração do produto nomeadamente a oxidação dos ácidos gordos insaturados quando aplicados a um género alimentício. Assim sendo, foi-se averiguar se existia uma correlação entre as variáveis sendo estas, o índice de TBA (indicador de oxidação e peroxidação lipídica) e as amostras das películas (FRAP e ABTS), e verificou-se pelo coeficiente de correlação(r) de *Pearson* que não existia uma relação entre as variáveis.

#### **4.3.4. Determinação do teor de humidade**

Na figura 19 encontram-se descritos os valores obtidos do teor humidade (%) das diferentes amostras e apresentam as perdas de água pela exsudação durante a fritura. Os polissacáridos apresentam boas propriedades de formação de películas e boa barreira aos gases, todavia, sendo hidrofílicos, não proporcionam boa barreira à humidade (Kester & Fennema, 2015).



**Figura 19** - Teor de umidade das amostras, determinado gravimetricamente (por diferenças) expresso em porcentagem. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados de três ensaios independentes.

**Legenda das abreviaturas:** Alg- alginato, AlgE<sub>1</sub> – alginato com extrato 1(*Codium tomentosum*), AlgE<sub>6</sub>- alginato com extrato 6(*Fucus spirulis*), Gel – gelatina de peixe, GelE<sub>1</sub> – gelatina de peixe com extrato 1(*Codium tomentosum*), GelE<sub>6</sub> – gelatina de peixe com extrato 6 *Fucus spirulis*).

Por norma quando uma amostra é frita há migração da água para o óleo e perda de suculência do produto submetida à fritura. Durante o ensaio da determinação da umidade, figura 19, foi possível observar que as amostras com alginato foram as que tiveram maior teor de umidade, podendo a origem provir do revestimento e não da cavala, visto que a amostra fresca (cavala sem revestimento ou frita) apresenta um valor médio inferior às amostras de alginato. Ao tanto que as amostras de Alg(alginato) e Fresco são estatisticamente significativas com um *p-value* = 0,008, anexo 10.

De acordo com Kester e Fennema (2015), os revestimentos ou películas que na sua constituição têm polissacarídeos não estabelecem uma boa barreira à umidade, permitindo a saída desta. Posto isto, as amostras de alginato (origem polissacarídea) são as que exibem pior barreira ao teor de umidade tendo todas as películas com este analito uma percentagem superior a 50%, indo ao encontro da revisão bibliográfica e do esperado, tendo o AlgE<sub>6</sub> obtido o maior valor (56,2%). Outrossim, as amostras de gelatina de peixe foram as que sofreram maior migração de água consistindo assim no pior conjunto de amostras como barreira à umidade, tendo valores médios abaixo de 40%.

Ainda se verificou que ocorreu um erro durante o procedimento experimental na medição do valor do frito sem revestimento, porque apresenta um valor superior ao Fresco e seria expectável que fosse inferior visto que foi sujeito a fritura e perderia parte da água nele contido.

## 5. Conclusões

Os resultados obtidos nas condições de realização desta pesquisa permitem inferir que:

Numa fase preliminar, foram testados cinco extratos diferentes e verificou-se que os extratos *Porphyra*, *Pelvetia* e *Fucus* apresentaram melhores resultados em termos de atividade antioxidante, compostos fenólicos, porém por terem amostra insuficiente (extrato *Porphyra*, *Pelvetia*), para realizar a segunda etapa do processo experimental (produção de películas) foram selecionadas para prosseguir com o estudo apenas os extratos *Codium* e *Fucus*. Sendo a *Codium* o extrato subsequente com melhor resultados açucares simples. Relativamente a quantidade de açucares presentes na amostra a *Gelidium* foi a que obteve maior valor, mas não se usou pela mesma razão mencionada acima.

O facto de se ter usado extratos com pouca quantidade de polissacáridos, pode ter sido uma das razões pelas quais não se formaram películas, e daí a necessidade de se produzir soluções filmogénicas com biopolímeros comerciais (alginato e gelatina de peixe) com extratos de algas para introduzir atividade antioxidante.

Os resultados do ensaio de otimização das soluções filmogénicas permitiram escolher o alginato e gelatina de peixe com as concentrações:

(i) 1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H<sub>2</sub>O (no caso de adição do extrato 1 ou 6 é 30% (m/m alginato))

(ii) 5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H<sub>2</sub>O (no caso da adição dos extratos 1 ou 6 foi num teor de 30% (m/m gelatina de peixe))

As soluções filmogénicas anteriores foram aplicadas em filetes de cavala antes da fritura e avaliou-se o efeito do revestimento quanto ao teor de humidade, absorção de C18:1(n9) e C18:2(n6) (ácidos gordos presentes no óleo) e valor de TBA.

As amostras à base gelatina de peixe foram os que apresentaram menores teores de lípidos e menor humidade. Estes resultados sugerem que as películas Gel funcionaram como uma barreira à migração de lípidos do óleo para o peixe, mas promoveram a saída de água do peixe para o óleo.

Analogamente o parâmetro TBA dos filetes que continham revestimento à base de AlgE<sub>6</sub> (alginato com extrato 6) sofreram menos oxidação face às restantes amostras, concluindo-se assim que maior atividade antioxidante no revestimento corresponde menores índices de TBA.

A incorporação de extratos (*Codium* e *Fucus*) não acrescentou vantagens, exceto no índice de TBA, no controlo dos parâmetros mencionados acima, ao tanto que o revestimento que maioritariamente obteve melhores resultados foi o Gel. Devido às vantagens e limitações de cada categoria de componentes das películas e revestimentos, o uso de combinações (compósitos) desses materiais seria uma opção viável para melhorar as propriedades das películas e revestimentos.

## 6. Perspetivas de trabalho Futuro

Em síntese, este trabalho contribuiu para um melhor entendimento do comportamento dos revestimentos comestíveis no que diz respeito às suas propriedades e composição química. Juntamente permitiu avaliar a eficiência na preservação de compostos nutricionais de pescado quando expostos ao processo de fritura. Seria, porém, interessante estudar os seguintes aspetos em trabalhos futuros:

- Estudar outros compostos de interesse alimentar nomeadamente o teor proteico proveniente das macroalgas para acrescentar valor nutricional à matriz ao qual é aplicado;
- Estudar se a incorporação dos extratos *Gelidium*, *Porphyra* e *Pelvetia* desempenha alguma função de aumento da atividade antioxidante quando adicionado a películas de alginato ou gelatina de peixe;
- Testar a nível de um painel de provadores a aceitabilidade no *flavour* da incorporação destes revestimentos comestíveis;
- Testar outros hidrocolóides que proporcionem uma melhor barreira à humidade e oxidação (gases);
- Estudar a aplicação destes revestimentos comestíveis em outros peixes gordos, nomeadamente a sardinha, salmão etc.;
- Avaliar o  $a_w$  para completar o estudo da humidade nas amostras;
- Fazer um estudo onde se compara os valores obtidos experimentalmente dos lípidos totais e dos ácidos gordos em relação aos rotulados;
- Estudar e testar formulações de revestimentos do grupo compósitos.

## 7. Referências Bibliográficas

Costa, M. J., Marques, A. M., Pastrana, L. M., Teixeira, A., Sillankorva, S. M., & Cerqueira, M. A. (9 de Março de 2018). Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. *Science Direct*, 81(Food Hydrocolloids), 442-448.

Mekini', I. G., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Perković, Z. P. (22 de junho de 2019). Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. *MDPI(biomolecules)*, 25.

Paiva, L., Lima, E., Neto, A. I., & Baptista, J. (26 de julho de 2018). Seasonal Variability of the Biochemical Composition and Antioxidant Properties of *Fucus spirulis* at Two Azorean Islands. *MDPI*, 8(Marine drugs), 16.

Raghav, P. K., Agarwal, N., & Saini, M. (2016). Edible coating of fruits and vegetables: a review. *International Journal of Scientific Research and Modern Education (IJSRME)*, 1, 2455 – 5630.

Acope - Associação dos comerciantes de pescado. (22 de Dezembro de 2016). *Exportações de produtos de pesca portuguesas crescem desde 2012*. Obtido de Agronegocios: <http://www.agronegocios.eu/noticias/exportacoes-de-produtos-de-pesca-portugueses-crescem-desde-2012/>

Ahmad, T. B. (2015). *Methods for quantification and extraction of fucoïdan, and quantification of the release of total carbohydrate and fucoïdan from the brown algae Laminaria hyperborea*. Dissertation, Norwegian University of Science and Technology, Biotechnology, Norwegian.

Algaebase. (2013). *Fucus spirulis Linnaeus 1753*. Obtido em fevereiro de 2020, de Algaebase: [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?tc=accept&species\\_id=86](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?tc=accept&species_id=86)

ALIF. (2018). *Já são conhecidas as quotas de pesca para Portugal*. Obtido de ALIF - Associação da Indústria Alimentar pelo Frio: <http://www.alif.pt/noticias/188-ja-sao-conhecidas-as-quotas-de-pesca-para-portugal.html>

Alvarez, L. (7 de Janeiro de 2019). *Peixe nunca foi tão caro em Portugal como no ano passado*. Obtido de Publico: <https://www.publico.pt/2019/01/07/economia/noticia/peixe-tao-caro-portugal-ano-passado-1856913>

Amorim, M. J., Almeida, J., Pereira, R., & Mendonça, S. (2 de Julho de 2018). *Fritadeiras a ar não são solução mais saudável*. Obtido de Deco proteste: <https://www.deco.proteste.pt/eletrodomesticos/equipamentos-cozinha/noticias/fritadeiras-a-ar-nao-sao-solucao-mais-saudavel>

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127.

Aphotomarine. (2019). *Porphyra umbilicalis Kützing, 1843 - Tough Laver (Red seaweed images)*. Obtido de Aphoto: [http://www.aphotomarine.com/red\\_seaweed\\_porphyra\\_umbilicalis\\_purple\\_laver\\_nori.html](http://www.aphotomarine.com/red_seaweed_porphyra_umbilicalis_purple_laver_nori.html)

ASAE. (Abril de 2017). *Óleos de Fritura*. Obtido de ASAE: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/conselhos-praticos-para-os-consumidores/oleos-de-fritura.aspx>

Associação dos comerciantes de pescado. (2019). *Benefícios de consumo*. Obtido de ACOPE: <https://www.cope.pt/peixe-a-mesa/beneficios-do-consumo-de-pescado.html>

Astorga, M. S., Díaz Romero, C. D., Rodríguez, B., & Rodríguez, E. M. (Maio de 2015). Journal of Food Composition and Analysis. *Science Direct*, 39(Mineral and trace element concentrations in seaweeds from the sub-Antarctic ecoregion of Magallanes (Chile)), 69-76.

Baldwin, E. A., Nisperos, M. O., Chen, X., & Hagenmaier, R. D. (1996). Postharvest Biology and Technology. Em E. Baldwin, *Improving storage life of cut apple and potato with edible coating* (Vol. 9). Australia and USA: Elsevier.

Bertolin, T. E., Guarienti, C., Farias, D., Souza, F. T., Gutkoski, L. C., & Colla, L. M. (29 de outubro de 2009). Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. *SciELO*, 4(TBA), 751-757.

Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*(15), 1-12.

Carrola, A. C. (12 de 2016). *O Desperdício Alimentar no Plano de Ação para a Economia Circular e na Revisão do Pacote de Resíduos*. Obtido em 01 de 2019, de Agência Portuguesa do Ambiente: [http://www.gpp.pt/images/MaisGPP/Iniciativas/CNCDA/CNCDA\\_Plenria\\_11Abril\\_APA.pdf](http://www.gpp.pt/images/MaisGPP/Iniciativas/CNCDA/CNCDA_Plenria_11Abril_APA.pdf)

Cherian, G., Holsonbake, T. B., & Goeger, M. P. (2002). Fatty Acid Composition and Egg Components of Specialty Eggs. *Poultry Science*, 81, 30-33.

Comissão Europeia. (Junho de 2015). *Economia Circular*. Obtido de COTEC Portugal: [http://www.cotecportugal.pt/imagem/20161122\\_EC\\_Booklet\\_Exposiçao.pdf](http://www.cotecportugal.pt/imagem/20161122_EC_Booklet_Exposiçao.pdf)

Connor, D. W., Allen, J. H., Golding, N., Howell, K. L., Lieberknecht, L. M., Northern, K. O., & Reker, J. B. (29 de Junho de 2019). *Pelvetia*. Obtido de wikipedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pelvetia>

de la Caba, K., Guerrero, P., Si Trung, T., Cruz, M., Kerry, J. P., Fluhr, J., Newton, R. (4 de Outubro de 2018). *Convertiendo los residuos del pescado y mariscos en empaques*. Obtido de Aquahoy: <https://www.aquahoy.com/i-d-i/valor-nutricional/32324-economia-circular-convertiendo-los-residuos-del-pescado-y-mariscos-en-empaques>

de Souza Abud, A. K., & de Farias Silva, C. E. (2019). Chapter 21 - Bioethanol in Brazil: Status, Challenges and Perspectives to Improve the Production. Em *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 417-443). Brasil: Elsevier Inc.

Dehghani, S., Regenstein, J., & Hosseini, S. V. (11 de julho de 2017). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240, 505-513.

Deloitte. (2014). *A importância da IAA para o crescimento da economia Ambição 2020 – na rota do crescimento*. Obtido de FIPA - Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares: [https://www.fipa.pt/uploads/fotos\\_artigos/files/Ambicao2020\(1\).pdf](https://www.fipa.pt/uploads/fotos_artigos/files/Ambicao2020(1).pdf)

Dhall, R. (07 de Fevereiro de 2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(Abstract), 435-450. Obtido de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391012>

DocaPesca. (2016). *Perfil genérico dos consumidores de Peixe em Portugal - Dados recolhidos pelo inquérito*. Obtido de Docapesca: <https://sites.google.com/site/docapescalikeit/gcd---gesto-de-canais-de-distribuio/o-consumo-de-peixe-em-portugal/3-2-o-perfil-dos-consumidores-de-peixe/3-2-1-perfil-generico-dos-consumidores-de-peixe-em-portugal---dados-recolhidos-pelo-inquerito>

Economia. (2019). *O que é a economia circular*. Obtido de Economia: <https://eco.nomia.pt/pt/economia-circular/estrategias>

Embacado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables*. USA: Springer.

EMFF. (2013). *European Maritime and Fisheries Fund (EMFF)*. Obtido de European Commission: [https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/op-portugal-fact-sheet\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/op-portugal-fact-sheet_en.pdf)

Estatística, I. -I. (Edição 2018). *Estatísticas da Pesca - 2017*. (I. P. Instituto Nacional de Estatística, Ed.) Portugal. Obtido de INE- Instituto Nacional de Estatística.

FAO. (2017). *Fishery and Aquaculture Country Profiles*. Obtido de FAO: <http://www.fao.org/fishery/facp/PRT/em>

Fernandes, J. D. (2019). *Métodos para confeccionar os alimentos*. Obtido de Jacqueline: <http://nutricionista.com.pt/artigos/metodos-para-confeccionar-os-alimentos.jhtml>

Fernandes, M. (17 de Agosto de 2017). *ONG defende consumo de peixes locais para reduzir impacto ambiental*. Obtido de RFI: <http://br.rfi.fr/ciencias/20170810-meio-ambiente>

Fernandez, R. E., Lebiga, E., Koklu, A., Sabuncu, A. C., & Beskok, A. (Outubro de 2015). Flexible Bioimpedance Sensor for Label-Free Detection of Cell Viability and Biomass. *IEEE*, 14, 700 - 706.

Ferreira, J. (2017). *Ómeegas 3 e 6*. Obtido em 11 de 2018, de Fundação Portuguesa de Cardiologia: <http://www.fpcardiologia.pt/omegas-3-e-6/>

Ferreira, J. (2019). *Confeções Saudáveis*. Obtido de Fundação Portuguesa de Cardiologia: <http://www.fpcardiologia.pt/confeco-es-saudaveis/>

Fiset, C., Liefer, J., Irwin, A. J., & Finkel, Z. V. (2017). Methodological biases in estimates of macroalgal macromolecular composition. *Association for the Sciences of Limnology and Oceanography*, 15(Estimates of macroalgal macromolecular composition), 618–630.

*Fisheries and Aquaculture Department*. (2019). Obtido de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/home/en/>

Folch, J., Lees, M., & Sloane, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *PubMed*, 226, 497-509.

Food Engineering World. (15 de Janeiro de 2011). *Conservação de alimentos: o método da apertização e a utilização de raios ultravioletas*. Obtido de Food Engineering World: <http://foodengineeringworld.blogspot.com/2011/01/conservacao-de-alimentos-o-medoto-da.html>

Garcia, K., Coelho, A., & Silva, W. (2016). Efeitos da adição do plastificante glicerol sobre as propriedades de filmes de amido de fruta-pão (*Artocarpus altilis*). *XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, (p. 5). Brasil.

García, M. A., Campos, C., Bifani, V., Martino's, M. N., Sobral, P., Flores, S., Silva Weiss, A. C. (Fevereiro de 2008). Food Engineering: Integrated Approaches. *Researchgate*(Edible Coating as an Oil Barrier or Active System), 225-241.

Gennadios, A., Brandenburg, A. H., Park, J. W., Weller, C. L., & Testin, R. F. (1994). Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. Em *Industrial Crops and Products* (Vol. 2, pp. 153-258). ScienceDirect.

Gomez-Guillen, M., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (4 de junho de 2006). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Science Direct*, 21(Food Hydrocolloids), 1133–1143.

Gomez-Zavaglia, A., Lage, M. A., Jimenez-Lopez, C., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (17 de setembro de 2019). The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value. *MDPI*, 8(Antioxidants), 406.

Gonçalves, A. I. (2007). *Efeito da Aplicação de Revestimentos Comestíveis Enriquecidos em Antioxidantes na Conservação de Frutos Minimamente Processados*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, Lisboa.

Green World. (2019). *Pesca sustentável: A sustentabilidade também passa pelo nosso prato*. Obtido de Noctula channel: <https://noctulachannel.com/sustentabilidade-pesca/>

Hasan-Amer, R., & Carmeli, S. (20 de Dezembro de 2017). Marine drugs. *Inhibitors of Serine Proteases from a Microcystis sp. Bloom Material Collected from Timurim Reservoir*, 12, p. 14.

Hermund, D. B. (2018). Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances. Em E. Inc. (Ed.), *Bioactive Seaweeds for Food Applications* (pp. 201-221). Yimin Qin.

Hernandez, Á. G. (2005). *Tratado de nutrición, tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (Vol. 2). Espanha: Acción Médica. Obtido de Pesca PT: <https://www.pesca-pt.com/valor-nutricional-peixe>

Homayouni, A., Ebrahimi, B., Homayoonpour's, F., Salmasi's, D. A., & Baharbanafshe's, M. (24 de Outubro de 2018). Formulation of stable frying oil for food industry by using various edible oils and antioxidants. *Current Nutrition & Food Science*, 15, 1-6.

- Huber, K. C., & Embuscado, M. (s.d.). Lipid-Based Edible Films and Coatings. *ResearchGate*, 135-168.
- Huber, Kerry C.; Embuscado, Milda. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*. USA: Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- INE | DGRM/MM. (2019). *Peixe capturado: total e por principais espécies*. Obtido de Pordata: <https://www.pordata.pt/Portugal/Peixe+capturado+total+e+por+principais+espécies-3450>
- INE, I. N. (2018). *Estatística da Pesca 2017*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P.
- INF. (2000). *INF*. Obtido em fevereiro de 2020, de [http://www.inf.ufsc.br/~vera.carmo/Correlacao/Correlacao\\_Pearson\\_Spearman\\_Kendall.pdf](http://www.inf.ufsc.br/~vera.carmo/Correlacao/Correlacao_Pearson_Spearman_Kendall.pdf)
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*. (2016). Obtido em 11 de 2018, de Tabela de Composição dos Alimentos: <https://insa.foodcase.ch/>
- Instituto Nacional Ricardo Jorge. (2010). *Detalhe Alimento : cavala crua*. Obtido de Instituto Nacional Ricardo Jorge: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS820>
- Ipma. (2019). *ácidos gordos*. Obtido em 08 de 2019, de Ipma: <https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/pescado/site/introducao/acgordos.htm>
- Ipma. (2019). *Lípidos*. Obtido em 09 de 2019, de Ipma: <https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/pescado/site/introducao/lipidos.htm>
- Iverson, S. J., Lang, S. L., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Pub Med*, 11, 1283-1287.
- Jacinto, V. (19 de Setembro de 2009). *Velvet Horn seaweed (Codium tomentosum)*. Obtido de flickr: <https://www.flickr.com/photos/valter/3945972884>
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewar, H. S. (8 de fevereiro de 2011). Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *MDPI*, 9(marine drugs), 196–223.
- Kapalka, G. M. (2010). Practical Resources for the Mental Health Professional. Em *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents* (pp. 71-99). Academic Press.
- Kedare, S., & Singh, R. (Agosto de 2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Food Science and Tecnology*, 4, 412–422.
- Kester, J., & Fennema, O. (2015). Edible Films and Coatings: A Review. *Scientific Research Publishing*, 6(Food Technology), 47-51.

Kilincceker, O., & Hepsag, F. (Maio de 2012). Edible Coating Effects on Fried Potato Balls. *Researchgate*, 5(Food Bioprocess Technol), 1349–1354.

Kim, S. J., Sukumaran, A., & Venkatesan, J. (Julho de 2017). Introduction to Seaweed Polysaccharides. *Research Gate*, 1-9.

Kirschnik, P. G., & Macedo-Viegas, E. M. (4 de Fevereiro de 2009). Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a -18 °C. *The Scientific Electronic Library Online*, 29.

Lim, R., Stathopoulos, C., & Golding, J. (2011). Effect of edible coatings on some quality characteristics of sweet cherries. *International Food Research Journal*, 1237-1241.

Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60-75.

Lipor. (2019). *Economia Circular: Conceito e Benefício*. Obtido de Lipor: <https://www.lipor.pt/pt/>

López-Caballero, E., Gimenez, B., Montero, P., Gomez-Guillen, M., Gómez-Estaca, J., & Perez-Mateos, M. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Elsevier*, 3-16.

Mallikarjunan, P. K., Chinnan, M. S., Balasubramaniam, V. B., & Phillips, R. D. (25 de Maio de 2002). Edible Coatings for Deep-fat Frying of Starchy Products. *ScienceDirect*, 30, 709-714.

Marques, V., Zwolinski, J., Martins, M. M., & Skagen, D. (2013). *Changes in the abundance and spatial distribution of the Atlantic chub mackerel (Scomber colias) in the pelagic ecosystem and fisheries off Portugal*, 4, p. 551.

Martínez, D. F., Castellanos, F. J., & Bravo, J. E. (dezembro de 2015). Application of edible coatings in green plantain slices subjected to deep-fat frying. *SciELO*, 17.

Minozzo, M. G. (2011). *Processamento e Conservação do Pescado*. Obtido em 10 de 2019, de Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia: [http://proedu.rnp.br/bitstream/handle/123456789/411/Processamento\\_e\\_Conservacao\\_do\\_Pescado.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://proedu.rnp.br/bitstream/handle/123456789/411/Processamento_e_Conservacao_do_Pescado.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Misurcova, L. (novembro de 2011). Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology. (L. John Wiley & Sons, Ed.) *Rese*, 1(Chemical Composition of Seaweeds), 171-192.

Mouga, T. (2018). *Extraction procedure*. Leça de Palmeira.

MSC. (2019). *O que é a pesca sustentável*. Obtido de Marine Stewardship Council: <https://www.msc.org/pt/o-nosso-trabalho/o-nosso-proposito/o-que-e-a-pesca-sustentavel>

Msd. (Fevereiro de 2018). *O colesterol é um tipo de gordura (lípidio) natural que circula no sangue e que é necessário ao bom funcionamento do nosso organismo*. Obtido de MSD inventing for life: <https://msd.pt/doencas-cardiovasculares/colesterol/>

NP 2282 . (1991). Preparação das amostras de pescado e determinação do teor de humidade.

NP 2930 . (1988). Determinação do azoto básico volátil total em pescado, derivados e produtos à base de pescado.

NP 3356 . (1990). Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) em amostras de pescado.

*Os produtos do mar*. (2018). Obtido em 11 de 2018, de Dieta Mediterrânica: <http://dietamediterranea.net/?q=pt/node/70>

*Os produtos do mar*. (2018). Obtido de Dieta Mediterrânica: <http://dietamediterranea.net/?q=pt/node/70>

Osawa, C. C., Felicio, P. E., & Gonçalves, L. A. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *The Scientific Electronic Library Online*, 28, 655-663.

Parreidt, T. S., Müller , K., & Schmid, M. (17 de outubro de 2018). Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *MDPI*, 7(Foods), 170.

Pavlat, A. E., & Orts, W. J. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? *Semantic Scholar*(Edible Films and Coatings for Food Applications), 1-23.

Pereira, J. R. (2014). *Codium tomentosum: Avaliação do seu potencial de cultivo num sistema IMTA e do seu potencial biotecnológico*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade de Coimbra, Departamento de Ciências da Vida, Coimbra.

Pereira, L. (2009). As algas na nossa alimentação. Em L. Pereira, *Guia ilustrado das macroalgas - Conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa*. Coimbra, Portugal: Maria João Padez Ferreira de Castro. Obtido de ciência viva.

Pereira, L. (2009). *Guia ilustrado das Macroalgas - conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa*. Coimbra, Portugal: Maria João Castro. Obtido de [https://books.google.pt/books?id=k-IMxD9pn7UC&pg=PT43&lpg=PT43&dq=ep%C3%ADfitas+filamentosas&source=bl&ots=gJMXngpJem&sig=XLgdEOZ8IOciTqL2Y\\_4srntZMo&hl=ptPT&sa=X&ved=2ahUKEwi4wM2m3OXeAhWxxoUKHSWMDiw4ChDoATAAegQICRAB#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?id=k-IMxD9pn7UC&pg=PT43&lpg=PT43&dq=ep%C3%ADfitas+filamentosas&source=bl&ots=gJMXngpJem&sig=XLgdEOZ8IOciTqL2Y_4srntZMo&hl=ptPT&sa=X&ved=2ahUKEwi4wM2m3OXeAhWxxoUKHSWMDiw4ChDoATAAegQICRAB#v=onepage&q&f=false)

Pereira, L., Silva, J., & Costa, M. (2008). *Portuguese Seaweed Website*. Obtido de Macoi: <http://macoi.ci.uc.pt/imagem.php?id=1501&tp=7>

Pesca, D. (2019). *Sustentabilidade*. Obtido de Doca pesca: <https://sites.google.com/site/docapescacreative/consumo-de-peixe-em-portugal>

Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1, 20.

Porta, R., Mariniello, L., Sorrentino, A., Giosafatto, V. C., Marquez, G. R., & Prospero Di Pierro, M. E. (25 de Outubro de 2012). *Water Barrier Edible Coatings of Fried Foods*. Obtido em Outubro de 2019, de Journal of Biotechnology & Biomaterials: <https://www.omicsonline.org/water-barrier-edible-coatings-of-fried-foods-2155-952X.1000e116.php?aid=9681>

Raghav, P. K., Saini, M., & Agarwal, N. (Janeiro de 2016). Edible Coating of Fruits and Vegetables: a review. *Scientific Research and Modern Education (IJSRME)*, 1, 2455 – 5630.

Real, H., Barbosa, M., Carvalho, T., Craveiro, C., Real, H., Barbosa, M., Rodrigues, T. (Abril de 2016). *Pescar saúde*. Obtido de Associação Portuguesa de Nutricionistas: [https://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/E-book\\_pescado\\_Final\\_High.pdf](https://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/E-book_pescado_Final_High.pdf)

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology - the chemistry of wine stabilization and treatments* (Vol. 2). (C. Rychlewski, Ed.) West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

Rufino, M. d., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. d., Jiménez, J. P., & Saura-Calixto, F. D. (2006). *metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro FRAP*. Fortaleza.

Rufino, M. D., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Jiménez, J. P., & Saura-Calixto, F. D. (2007). *metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS*. Fortaleza.

Rufino, M. D., Alves, R. E., Sampaio, d. C., Brito, E. S., Morais, S. M., Jiménez, J. P., & Saura-Calixto, F. D. (2007). *Metodologia Científica: Determinação de atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Fortaleza.

Saúde, D. G. (2019). *Ómega 3*. Obtido em 01 de 2019, de Alimentação saudável: <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/nutriente/omega-3/>

Saha, D., & Bhattacharya, S. (dezembro de 2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of food science and technology*, 6(Hydrocolloids), 587–597.

*Scomber colias Gmelin, 1789 Atlantic chub mackerel*. (2019). (R. B. Reyes, Produtor) Obtido em 01 de 2019, de Fishbase: <https://www.fishbase.de/summary/Scomber-colias.html>

seaweed for dogs. (2019). *Minerals and Trace Elements in Seaweed*. Obtido em Setembro de 2019, de seaweed for dogs: <https://seaweedfordogs.com/pages/minerals-and-trace-elements-in-seaweed>

Shami, N. J., & Moreira, E. A. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de nutrição*, 17, 227-236.

Shepard, D. (24 de Junho de 2019). *População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050*. Obtido de ONU: <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>

Shyu, Y.-S., Chen, G.-W., Chiang, S.-C., & Sung, W.-C. (25 de maio de 2019). Effect of Chitosan and Fish Gelatin Coatings on Preventing the Deterioration and Preserving the Quality of Fresh-Cut Apples. *MDPI*, 24(molecules).

Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Cagalj, M., Perkovic, Z. P., & Mekinic, I. G. (22 de junho de 2019). Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. *MDPI*(biomolecules).

Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J., & Luo, Y. (8 de Outubro de 2010). Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephal*). *Sciencedirect*(Food Control), 608-615.

Sothornvit, R. (dezembro de 2011). Edible coating and post-frying centrifuge step effect on quality of vacuum-fried banana chips. *Journal of Food Engineering*, 107, 319-325.

Sousa, J. (11 de Outubro de 2018). *Consumo da carne terá que ser reduzido em 90% para evitar “colapso climático”*. Obtido de Jornal económico: <https://jornaleconomico.sapo.pt/noticias/consumo-da-carne-tera-que-ser-reduzido-em-90-para-evitar-colapso-climatico-365002>

*Teste de Kolmogorov-Smirnov*. (2020). (P. Action, Produtor) Obtido em 02 de 2020, de Portal Action: <http://www.portalaction.com.br/inferencia/62-teste-de-kolmogorov-smirnov>

*Teste de Kruskal-Wallis*. (2020). (P. Action, Produtor) Obtido em 02 de 2020, de Portal Action: <http://www.portalaction.com.br/series-temporais/241-teste-de-kruskal-wallis>

*Teste de Shapiro- Wilk*. (2020). (P. Action, Produtor) Obtido em 02 de 2020, de Portal Action: <http://www.portalaction.com.br/inferencia/64-teste-de-shapiro-wilk>

*Teste de Tukey*. (2020). (P. Action, Produtor) Obtido em 02 de 2020, de Portal Action: <http://www.portalaction.com.br/anova/31-teste-de-tukey>

Trindade, P., Valentão, P., Gomes, D., de Pinho, P. G., Mouga, T., & Andrade, P. B. (2009). Food Chemistry. Em P. Valentão, *Codium tomentosum and Plocamium cartilagineum : Chemistry and antioxidant potential* (Vol. 119). Leiria e Porto , Portugal: Elsevier Ltd. .

Valentão , P., Trindade, P., Gomes, D., Guedes de Pinho, P., Mouga, T., & Andrade, P. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *ScienceDirect*, 119(Food Chemistry), 1359–1368.

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements , D., & González-Martínez , C. (junho de 2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Pubmed*, 48, 496-511.

Wei, X., Xi, X., Wang, Y., & Chu, Q. (Janeiro de 2010). *determination of tea polysaccharides in camellia sinensis by a modified phenol-sulfuric acid method*, 3.

World Wide Fund for Nature. (2019). *Em breve poderemos não ter peixe para pescar, produzir ou comer*. Obtido de WWF: <http://guiapescado.wwf.pt/hard-facts/>

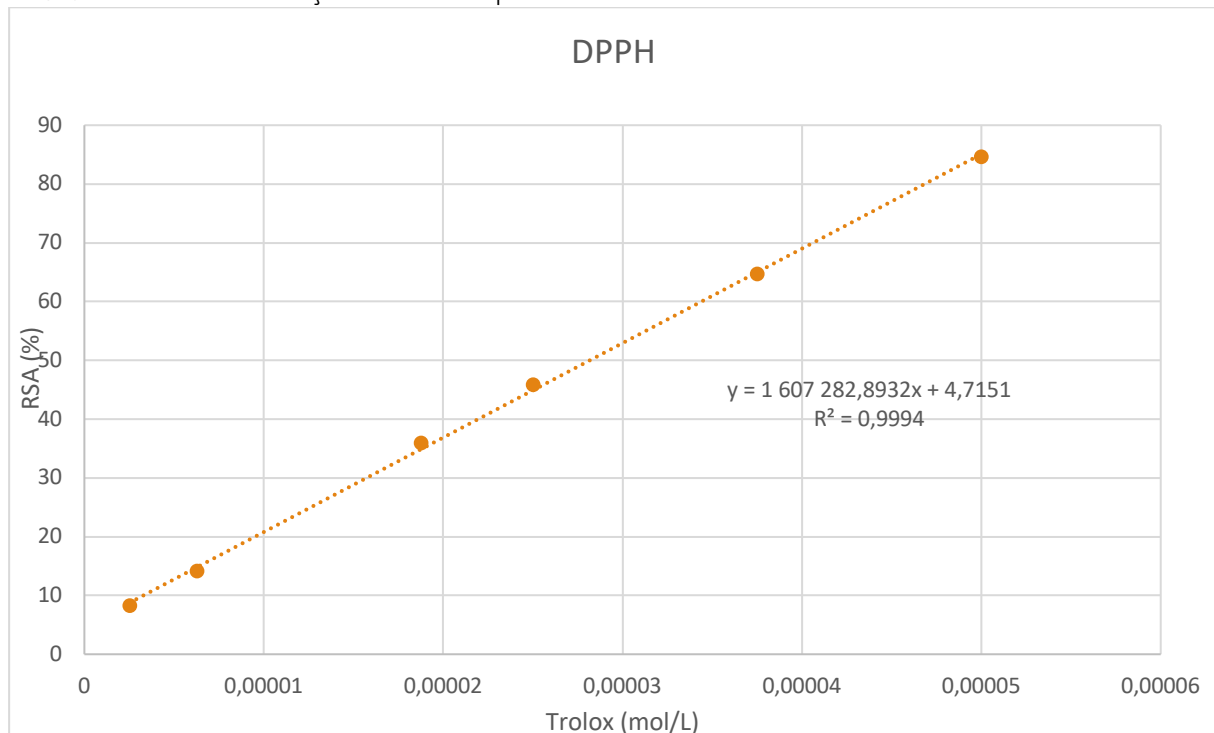
X-rite. (2007). *A Guide to Understanding Color Communication*. p. 26.

Youngson, R. (1995). *Como combater os radicais livres: Programa de saúde dos antioxidantes*. Campos, Rio de Janeiro, Brasil.

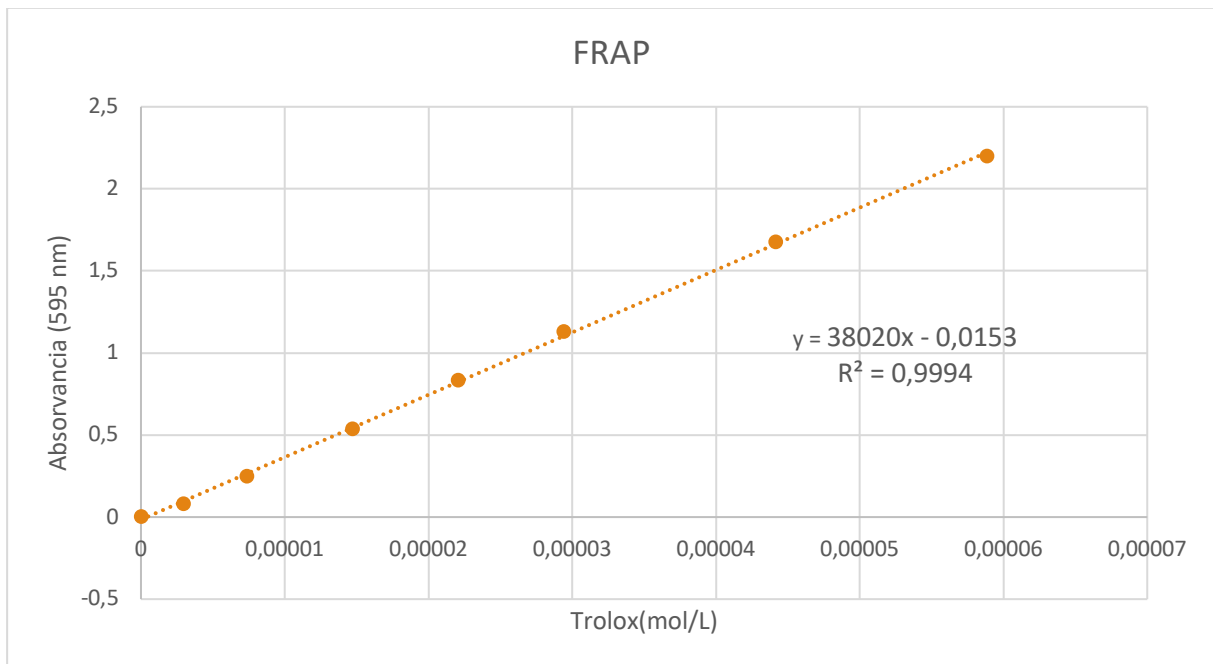
## 8. Anexos

### Determinação da atividade antioxidante

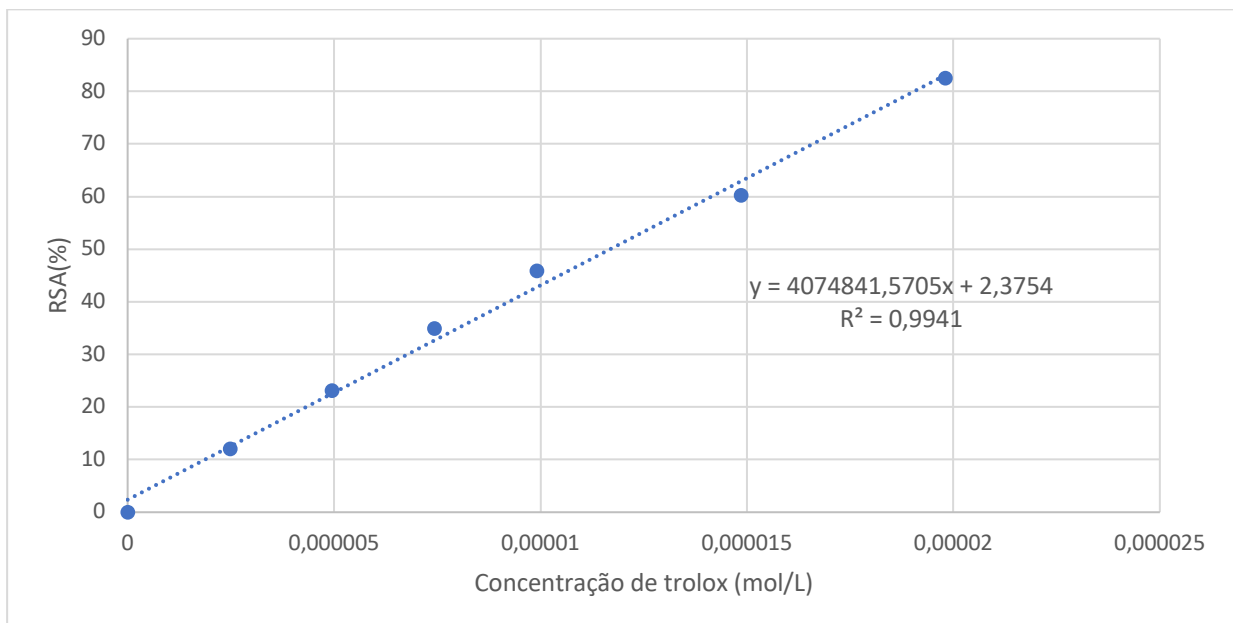
**Anexo 1.** Curva de Calibração com *Trolox* para o método DPPH



**Anexo 2.** Curva de Calibração com *Trolox* para o método FRAP

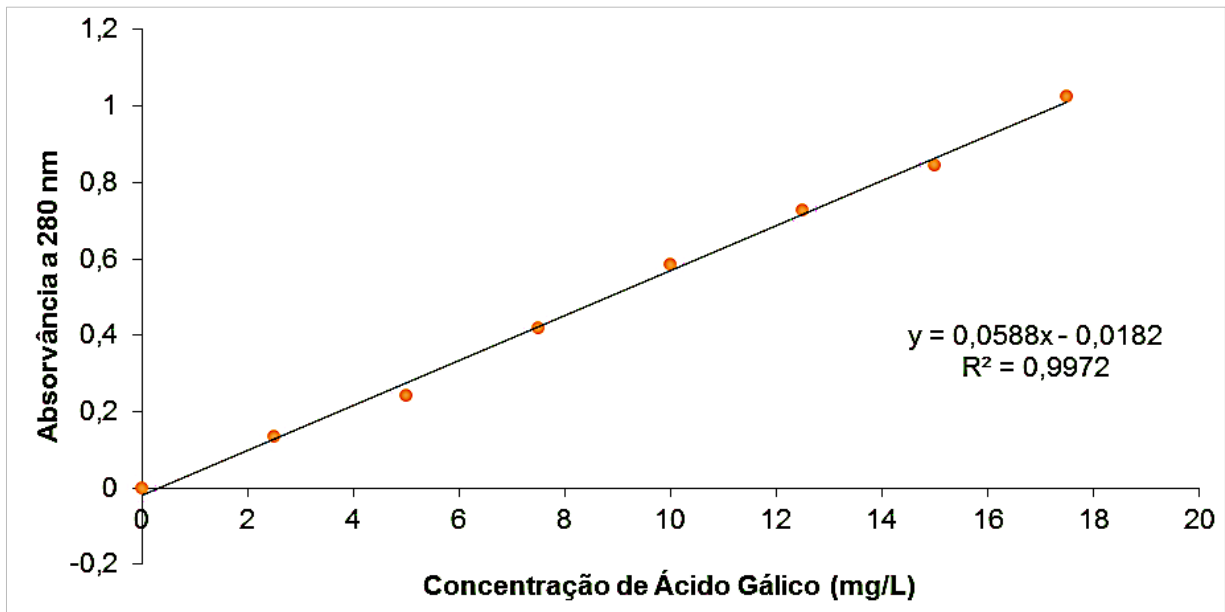


**Anexo 3.** Curva de Calibração com etanol para o método ABTS



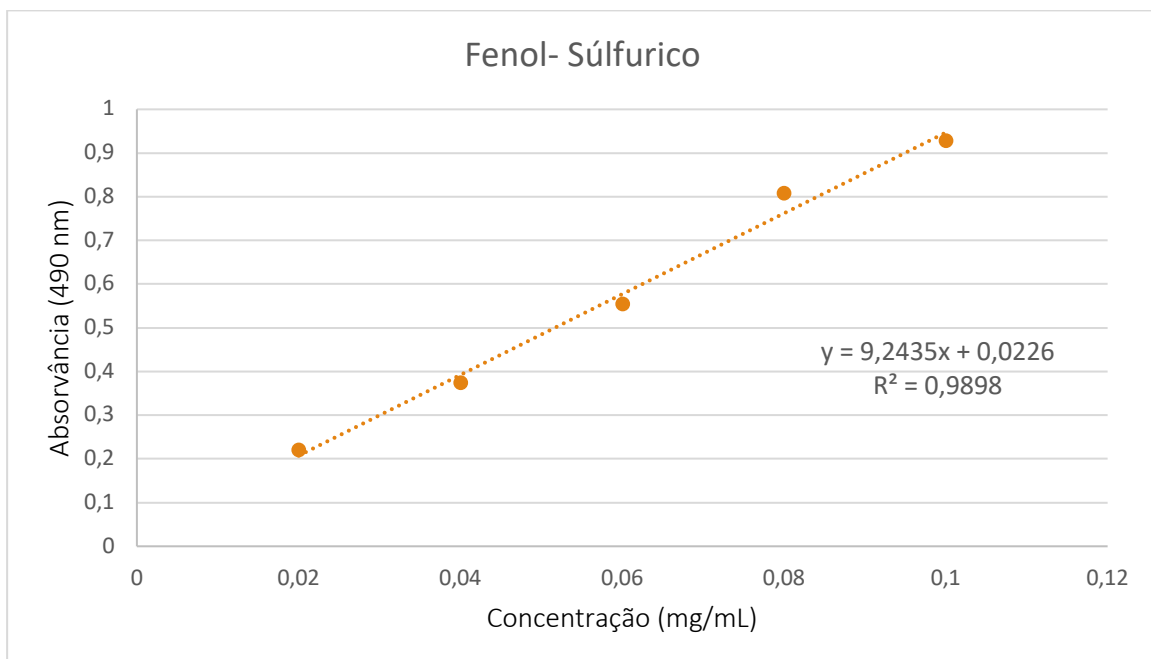
### Determinação dos Compostos fenólicos

**Anexo 4.** Curva de Calibração com Ácido Gálico para o método direto



Determinação dos açúcares

Anexo 5. Curva de calibração da Malto-dextrina com o método de Dubois



Polissacáridos das macroalgas

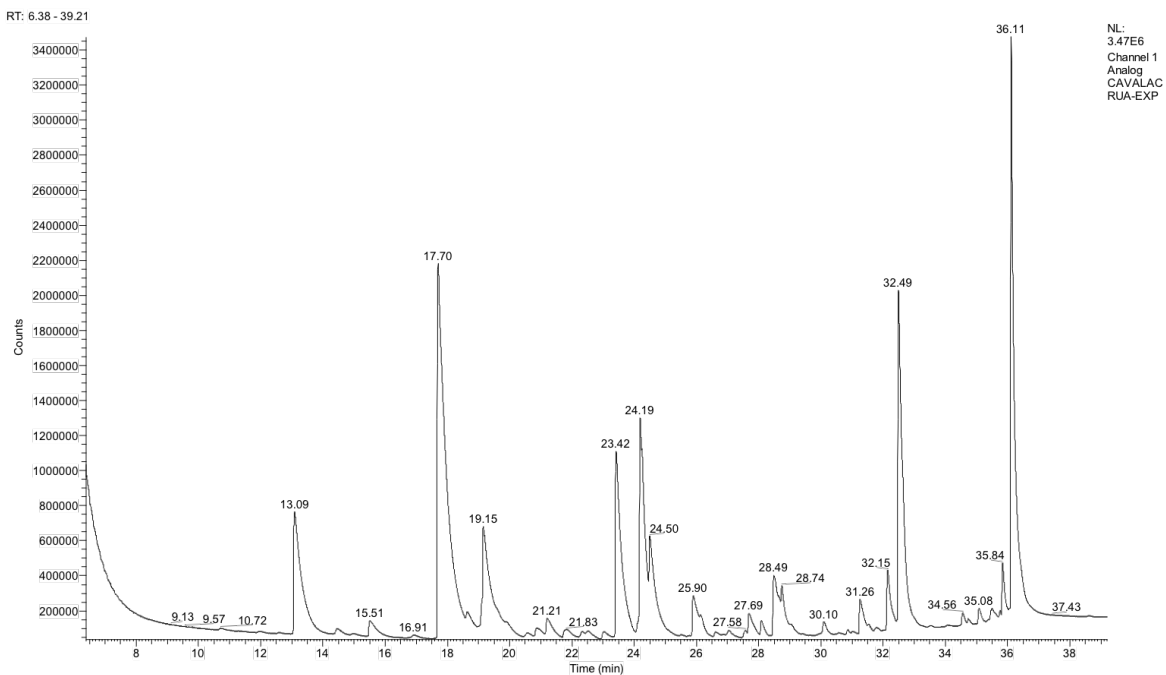
Anexo 6. Quadro com exemplos de polissacáridos presentes nas macroalgas marinhas (Misurcova, 2011)

Revestimentos comestíveis com incorporação de extratos de macroalgas para aplicação em filetes de peixe sujeitos a fritura

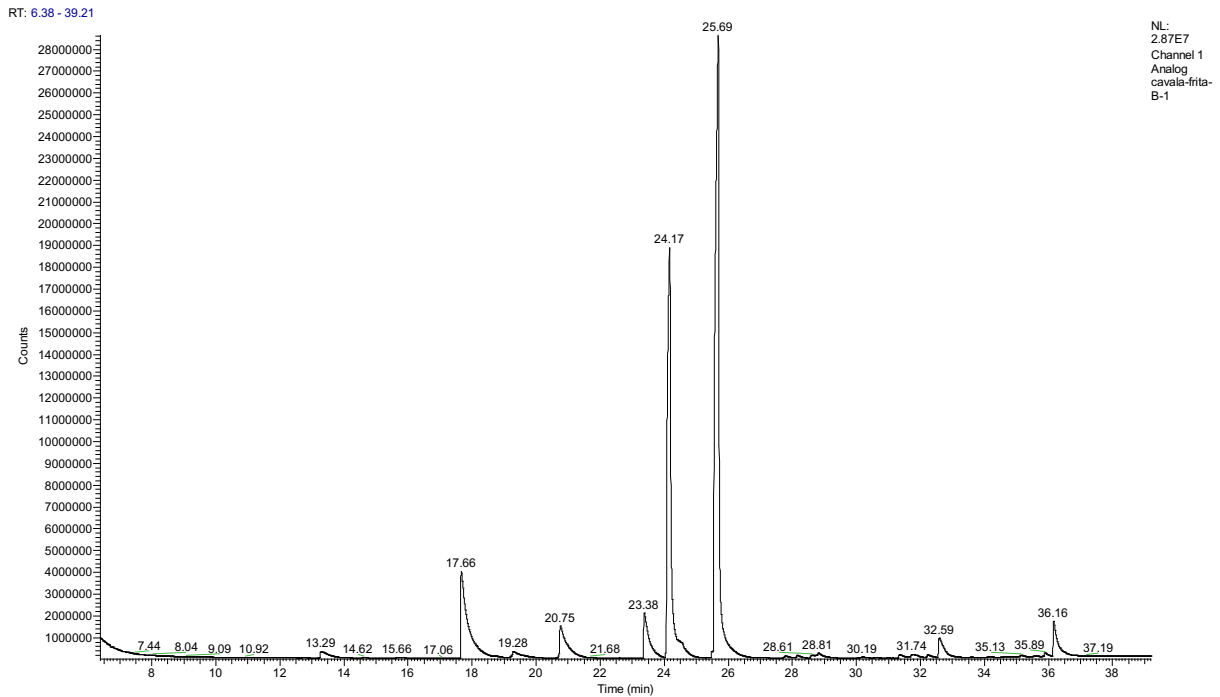
Seaweed	Polysaccharides	Main unit
Green	Starch	<b>Storage</b> $\alpha$ -D-glucose 20% amylose, 80–90% amylopectin
Red	Floridean starch	$\alpha$ -D-glucose amylopectin
Brown	Laminaran	(1,3)- $\beta$ -D-glucose and (1,6)- $\beta$ -D-glucose branch unit mannitol
Green	Ulvan-sulfated Xylan Mannan	<b>Structural</b> $\beta$ -D-glucuronosyl-(1,4)- $\alpha$ -L-rhamnose 3-sulfate $\beta$ (1,4)-D-xylose mannose (C-2 epimer of glucose)
Red	Carrageenans – sulfated Agar – sulfated Xylan Mannan	$\alpha$ (1,3)-galactose acid and $\beta$ -(1,4,3,6)-anhydro-D-galactose D-galactose acid and (3,6)-anhydro-L-galactose $\beta$ (1,4)-D-xylose mannose (C-2 epimer of glucose)
Brown	Alginate Fucoidan – sulfated fucans	$\beta$ -(1,4)-D-mannuronic acid and $\alpha$ -(1,4)-L-guluronic acid (1,2)- $\alpha$ -L-fucose-1-sulfate $\beta$ -(1,4)-D-mannuronic acid and 3-D-xylosyl-L-fucose-4-sulfate (1,4)-D-galactose and L-fucosyl-3-sulphate branch units – D-xylose, D-galactose and D-mannose
Green, red, brown	Cellulose	$\beta$ -(1,4)-glucose

Cromatogramas

Anexo 7. Amostra cavala crua ou fresca



Anexo 8. Amostra de cavala frita sem revestimento



### Análise Estatística

Anexo 9. Tabela da comparação múltiplas de variáveis

Fator		Teste	Sig. ou p-value	Teste	Sig. ou p-value	Comparações múltiplas entre pares de amostras
Extratos	TPC	<i>Kruskal Wallis</i>	0,010	<i>Bonferroni</i>	0,020 0,043	E <sub>1</sub> -E <sub>4</sub> E <sub>2</sub> -E <sub>4</sub>
	FRAP	<i>Kruskal Wallis</i>	0,012	<i>Bonferroni</i>	0,010	E <sub>2</sub> -E <sub>6</sub>
	DPPH	<i>ANOVA</i>	0,053	<i>Tukey</i>	0,000 0,000 0,000 0,000 0,000	E <sub>1</sub> -E <sub>4</sub> E <sub>1</sub> -E <sub>5</sub> E <sub>1</sub> -E <sub>6</sub> E <sub>2</sub> -E <sub>4</sub> E <sub>2</sub> -E <sub>5</sub> E <sub>2</sub> -E <sub>6</sub>
Películas	FRAP	<i>ANOVA</i>	0,000 <sup>6</sup>	<i>Tukey</i>	0,000	Alg e as restantes

<sup>6</sup> Aparece com zeros porque o programa SPSS v26 (2018) só apresenta os valores até às centésimas, contudo o p-value <0,05.

Revestimentos comestíveis com incorporação de extratos de macroalgas para aplicação em filetes de peixe sujeitos a fritura

					0,012	Gel-GelE <sub>6</sub>
	ABTS	<i>Kruskal</i>	0,008	<i>Bonferroni</i>	0,020	Gel-AlgE <sub>6</sub>
		<i>Wallis</i>			0,043	AlgE <sub>1</sub> -AlgE <sub>6</sub>

E<sub>1</sub> → Extrato aquoso de *Codium tomentosum*

E<sub>2</sub> → Extrato aquoso de *Codium tomentosum* obtido a partir de biomassa previamente extraída com etanol.

E<sub>3</sub> → Extrato aquoso de *Porphyra umbilicalis*

E<sub>4</sub> → Extrato aquoso de *Pelvetia canaliculata*

E<sub>5</sub> → Extrato aquoso de *Gelidium*

E<sub>6</sub> → Extrato aquoso de *Fucus spirulis*

Anexo 10. Tabela da comparação múltiplas de variáveis

Fator	Teste	Sig. ou p-value	Teste	Sig. ou p-value	Comparações múltiplas entre pares de amostras
TBA	<i>Kruskal</i> <i>Wallis</i>	0,000	<i>Bonferroni</i>	0,019	AlgE <sub>6</sub> -Frito s/
				0,007	AlgE <sub>6</sub> -GelE <sub>1</sub>
				0,000	AlgE <sub>6</sub> -GelE <sub>6</sub>
				0,000	AlgE <sub>6</sub> -Gel
				0,038	Alg-GelE <sub>1</sub>
				0,001	Alg-GelE <sub>6</sub>
				0,001	Alg-Gel
				0,018	Fresco-Gel
				0,018	Fresco-GelE <sub>6</sub>
				0,042	AlgE <sub>1</sub> -Gel
0,042	AlgE <sub>1</sub> -GelE <sub>6</sub>				
Humidade	<i>Kruskal</i> <i>Wallis</i>	0,002	<i>Bonferroni</i>	0,008	Fresco-Alg

Alg → 1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H<sub>2</sub>O.

AlgE<sub>1</sub> → 1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H<sub>2</sub>O, 30% (m/m alginato) de extrato 1 – *Codium tomentosum*.

AlgE<sub>6</sub> → 1% de alginato (m/m solução), 30% de glicerol (m/m alginato), 15 mL H<sub>2</sub>O, 30% (m/m alginato) de extrato 6 – *Fucus spirulis*.

Gel → 5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H<sub>2</sub>O

GelE<sub>1</sub> → 5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H<sub>2</sub>O, 30% (m/m gelatina de peixe) de extrato 1 – *Codium tomentosum*.

GelE<sub>6</sub> → 5% de gelatina de peixe (m/m solução), 20% de glicerol (m/m gelatina de peixe), 15 mL H<sub>2</sub>O, 30% (m/m gelatina de peixe) de extrato 6 – *Fucus spirulis*.

Anexo 11. Esquema do procedimento experimental do ponto 3.2. e 3.3.

