

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**INGRIDY SIMONE RIBEIRO CABRAL**

**Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

**São Paulo**

**2012**

**INGRIDY SIMONE RIBEIRO CABRAL**

**Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oetterer**

**São Paulo**

**2012**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Cabral, Ingridy Simone Ribeiro

Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*) / Ingridy Simone Ribeiro Cabral, orientadora Marília Oetterer. - - Piracicaba, 2012.

138 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aditivos alimentares 2 Compostos fenólicos 3. Deterioração de alimentos 4. Oxidação 5. Processamento de alimentos 6. Qualidade dos alimentos I. Título

CDU 678.048 : 639.2

**Ao Divino Espírito Santo,  
por guiar meus caminhos e me proteger sempre.**

**Aos meus pais, Ítalo e Madalena, por me darem a vida e serem meu exemplo de  
amor, luta e honestidade.**

**À minha irmã e madrinha Mileni, por ter sido minha segunda mãe  
e até hoje se preocupar tanto comigo.**

**E em especial ao meu marido Richardson...  
por compreender minhas falhas,  
por estar sempre por perto quando precisei de apoio,  
enfim, por ter sido o meu “porto seguro” nos momentos difíceis.**

**Dedico este trabalho.**

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o cimbalo que retine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse todos os meus bens para sustento dos pobres, e ainda que entregasse meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.”*

*1 Coríntios 13:1-3*



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Divino Espírito Santo por iluminar minha vida e me mostrar sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus pais, Ítalo e Madalena, e minha irmã Mileni, pelo carinho e apoio em todos os momentos que precisei.

Ao meu marido Richardson, o meu agradecimento especial por estar sempre ao meu lado e por tudo o que tem feito por nós dois.

Aos meus sogros, José Maria e Vera, e ao meu cunhado Rander, por acreditarem no meu sonho e entenderem que a distância era necessária para a realização dele.

Aos meus tios, tias e primos, por entenderem a minha ausência nas reuniões de família.

Ao primo Wellington Silva, pela ajuda na compra das algas marinhas.

Ao primo Prof. Dr. João Vergílio Gallerani Cuter, pela correção do *abstract* e por todo estímulo durante a minha caminhada na pós-graduação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oetterer, em primeiro lugar pela amizade e carinho desde que a conheci, pelo estímulo em todos os momentos, por aceitar ser minha orientadora no doutorado, pela confiança que sempre teve em mim e em tudo o que faço, e principalmente, por tudo o que me ensinou e pelo exemplo de pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Masaharu Ikegaki, da Universidade Federal de Alfenas, por me iniciar na carreira científica, por tudo o que me ensinou e pelos conselhos que sempre me deu.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, por continuar colaborando em meus projetos e por todo o conhecimento transmitido.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira, pela colaboração nas análises em Rancimat.

Aos professores Dr. Cláudio Rosa Gallo e Dr. Ernani Porto, pela imensa colaboração nas análises microbiológicas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Teresinha Carpes, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, antes de mais nada, pela amizade e carinho que sempre dedicou a mim, por ser minha parceira em todos os momentos, dividindo os sonhos e as angústias. E por colaborar diretamente no meu projeto e cessão das cepas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho, na forma de bolsa de doutorado e Auxílio Regular à Pesquisa.

Ao Dr. Pedro Gomes da Cruz, pelo auxílio nas análises estatísticas da tese.

À professora e amiga Leila Garcia, pelo carinho e amizade de sempre, e pelo exemplo de educadora.

À professora Márcia Dea Zákha Dias, por todo o conhecimento na língua portuguesa, que foi tão importante para a escrita da tese e artigos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente (CENA) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências do CENA-USP.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Pinheiro Martinelli, por me receber de braços abertos no CENA, pela amizade e carinho.

Aos funcionários do CENA: Neuda Fernandes de Oliveira, Claudia Marcia Corrêa, Fábio Antonio de Souza Oliveira, Sônia Aparecida Barros de Campos, pelos serviços burocráticos prestados e amizade!

Aos funcionários da ESALQ: Márcia Regina Severino Bertarelli, Regina Célia Cardoso Marafon, Maria Amábile Stabile Vendemiatti e Fábio Benedito Rodrigues pelos serviços burocráticos prestados e amizade. E à Elisvete Tertuliano, amiga querida, pela boa conversa e carinho!

À Equipe de Apoio do LAN-ESALQ: Jefferson Zambon, Eduardo Giovani Arthuso (Gil) e Wilson Januário, pelos serviços necessários de manutenção e reparo do laboratório durante a realização dos experimentos.

Às técnicas Cecília Helena Nogueira, Cleomar Maria de Carvalho, e Rosalina de Fátima Ochange pelo auxílio técnico nas análises microbiológicas e pela amizade.

Às funcionárias e amigas Juliana Antunes Galvão, Luciana Kimie Savay da Silva, Adna Prado e Ivani Aparecida Marchetto Moreno, por tudo o que fizeram por mim nesta caminhada.

Aos estagiários do GETEP: Amanda de Freitas Vieira, Adriana Figueiredo da Silva, Priscila Eloi Martins, Letícia Julião, Luiz Gustavo Franzini Travagin, Talita Aparecida Dias Bombarde, Tamires Zanin Celestino, Íris Gabrielle Alves Barbosa, Júlia Santos Vasconcelos, Aline (Sem parar) e Aline (Sét), pelo auxílio fundamental nas análises laboratoriais e pela amizade.

Ao Sr. Francisco Leão, por ceder a sua propriedade para realização da coleta de tilápia.

Ao laboratório de análises químicas CBO Assessoria & Analises, principalmente à Sra Oneida Vasconcellos e Lisandre Maia da Cunha.

E, quem tem amigos, tem tudo:

À amiga Ligianne Din Shirahigue Vianni, nem sei por onde começar: pelo carinho, amizade, por me ouvir nos piores momentos, pelos passeios, pelas viagens divididas, pela vibração em cada conquista, e principalmente, por toda a ajuda no desenvolvimento desta tese de doutorado... sem você eu não teria conseguido!

Às amigas Lia Ferraz de Arruda Sucasas e Lika Anbe, por estarem sempre ao meu lado, pelos sorrisos carinhosos, os abraços apertados, por dividirem comigo os momentos bons e os ruins, e por toda a ajuda na execução do projeto, pelas inúmeras vezes que me levaram a Campinas e, principalmente, na exaustiva viagem para coletar a tilápia, em Igaratá.

Aos amigos Werner Souza Martins, pela boa conversa, risadas e apoio no processamento final; e José Guilherme Prado Martin, pela amizade, troca de idéias e colaboração nas análises microbiológicas.

E aos amigos que dividiram bons momentos em Piracicaba: Tatiane e Cleverson; Jailson Capelleti; Rosângela Bezerra, Lucimara Fernanda, Adna Prado, Maria Fernanda Calil Angelini, Aline (Inmetro), Ana Paula (Fubá), Priscila (Compota), Keity, Rodrigo (Paxuxu), Paula (da Terra), Ana e Patrícia (as gêmeas), Érika da Silva Maciel, Luciana Kimie, Juliana Galvão, Myrella Castro, Ana Cláudia Ribeiro Rossi, Milena Martinelli Watanuki, Willey Sucasas, Daniel Korggo, Ricardo Vianni, Ivan Santiago e Juliana, Sr. Evaristo e D. Luzia, Eduval e Denise, Edson e Kátia Marques.

## **Coração de Estudante**

***(Milton Nascimento)***

Quero falar de uma coisa  
Adivinha onde ela anda  
Deve estar dentro do peito  
Ou caminha pelo ar  
Pode estar aqui do lado  
Bem mais perto que pensamos  
A folha da juventude  
é o nome certo desse amor

Já podaram seus momentos  
Desviaram seu destino  
Seu sorriso de menino  
Quantas vezes se escondeu  
Mas renova-se a esperança  
Nova aurora, cada dia  
E há que se cuidar do broto  
Pra que a vida nos dê  
flor, flor e... fruto!

Coração de estudante  
Há que se cuidar da vida  
Há que se cuidar do mundo  
Tomar conta da amizade  
Alegria e muitos sonhos  
Espalhados no caminho  
Verdes, plantas e sentimentos  
Folhas...  
Coração, Juventude e Fé.



## RESUMO

CABRAL, I.S.R. **Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2012. 138 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A extração de Carne Mecanicamente Separada de tilápia tem se destacado como um processo atraente pela possibilidade de maior recuperação da carne após a filetagem. Porém, a separação mecânica aumenta a superfície de exposição, levando à incorporação de oxigênio e conseqüentemente ao “off flavor” devido à rancidez, tornando necessário o uso de aditivos para sua conservação. A tendência é utilizar produtos naturais como alternativas aos aditivos químicos. Entre os produtos naturais, as algas marinhas apresentam, em sua composição, metabólitos secundários com alta atividade antioxidante e antimicrobiana. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a composição química e a atividade biológica de quatro algas marinhas e seus efeitos, quando aplicados em *Minced* de tilápia. As algas Nori, Kombu, Hijiki e Wakame foram extraídas por 2 e 7 dias, em temperatura ambiente, com etanol 60, 80 e 100%. O teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante e a antimicrobiana *in vitro* foram determinados. A atividade antioxidante por métodos acelerados, Rancimat e Oxipres, também foi avaliada. As algas bioativas tiveram seu perfil químico elucidado por cromatografia líquida e gasosa. Essas algas foram aplicadas em *Minced* de tilápia, que, em seguida, foi armazenado a -18°C por 180 dias. No *Minced* foram analisadas a composição centesimal, características de frescor por pH, BNVT e TBARS; cor instrumental, cor e aroma (de ranço) pela análise sensorial, padrões microbiológicos e composição de ácidos graxos, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento. Observou-se que a extração de 2 dias, com etanol 60%, foi a mais eficiente para extrair os compostos fenólicos. As algas Nori e Hijiki apresentaram os maiores teores desses compostos e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante *in vitro*. Os extratos de algas não apresentaram atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria monocytogenes*, os extratos mais eficientes foram os extraídos com etanol 100%. As algas Nori e Hijiki foram selecionadas como as mais bioativas e submetidas aos testes de oxidação acelerada. Quando aplicadas em óleo de soja, no Rancimat, e em *Minced* de tilápia, no Oxipres, estas algas demonstraram efetiva atividade antioxidante. Pela cromatografia, os principais compostos identificados foram, na Nori, os ácidos clorogênico, vanílico e caféico, além dos aminoácidos alanina, glicina, valina e prolina; bem como, glicose e sorbitol. Na alga Hijiki foram detectados os ácidos clorogênico, caféico e cinâmico; alanina e prolina, bem como, xilitol e ribitol, frutose e ácido linoléico. No teste de armazenamento congelado do *Minced*, por 180 dias, a aplicação dos extratos de Nori e Hijiki não influenciou na composição centesimal e pH. As algas mostraram-se eficientes no controle da produção das BNVT. No entanto, por TBARS, apesar de estarem dentro dos limites aceitáveis, as algas apresentaram comportamento pró-oxidante. Sob os aspectos microbiológicos, os minceds atenderam à legislação vigente. Sensorialmente, os provadores não detectaram diferença no “aroma de ranço”, apenas mínimas diferenças na cor do

produto. Pode-se concluir que o *Minced* de tilápia, adicionado de algas marinhas, manteve-se dentro dos padrões de qualidade durante o armazenamento congelado. Ressalta-se, ainda, a diferença na resposta antioxidante de acordo com o método utilizado.

**Palavras-chave:** Tilápia. *Minced*. Algas marinhas. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Compostos fenólicos. Oxidação. TBARS.

## ABSTRACT

CABRAL, I.S.R. **Seaweeds extracts as antioxidants and antimicrobial agents and their effects on quality of tilapia Minced (*Oreochromis niloticus*)**. 2012. 138 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The extraction of minced tilapia has emerged as an attractive process due to the possibility of greater recovery of the tissue after filleting. However, mechanical separation increases the surface exposure, leading to incorporation of oxygen and consequently to the "off-flavor" due to rancidity, making necessary the use of additives for its preservation. The tendency is to use natural products as alternatives to chemical additives. Among the natural products, seaweeds present in its composition secondary metabolites with high antioxidant and antimicrobial activities. This research aimed to evaluate the chemical composition and biological activities of four seaweeds varieties and their effects when applied to the tilapia Minced. Nori, Kombu, Hijiki and Wakame seaweeds were extracted by 2 and 7 days, at room temperature, with ethanol 60, 80 and 100%. The phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities *in vitro* were determined. The antioxidant activity by accelerated methods, Oxipres and Rancimat, were also evaluated. Seaweeds bioactive profiles were elucidated by liquid and gas chromatography. These seaweeds were applied to the tilapia Minced, that was stored at -18 °C for 180 days. The Minced were analyzed as to their composition, freshness characteristics by pH, TBARS and TVB-N, instrumental color, color and rancidity aroma by sensory analysis, microbiological standards, and fatty acid composition, at 0, 60, 120 and 180 days of storage. It was observed that the extraction after two days, with 60% ethanol, was the most efficient way to extract the phenolic compounds. Hijiki and Nori showed the highest levels of these compounds and therefore higher antioxidant activity *in vitro*. The extracts showed no antimicrobial activity against *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. For *Klebsiella pneumoniae* and *Listeria monocytogenes*, more efficient extracts were extracted with ethanol 100%. Hijiki and Nori seaweeds were selected as the most bioactive and submitted to accelerated oxidation tests. When applied in soy oil in the Rancimat, and tilapia Minced, in the Oxipres, these seaweeds have demonstrated effective antioxidant activity. By chromatography, the most important compounds identified were, in Nori, chlorogenic, caffeic and vanillic acids, besides the amino acids alanine, glycine, proline and valine, glucose and sorbitol. In the Hijiki seaweed, it was detected chlorogenic, caffeic and cinnamic acids, alanine and proline, as well as, ribitol and xylitol, fructose, and linoleic acid. In the test of frozen Minced storage, for 180 days, the application of Nori and Hijiki extracts did not modify neither the composition nor the pH. Seaweeds were effective in controlling the TVB-N production, but, for TBARS, although they were within acceptable limits, the seaweeds showed pro-oxidant activities. As to the microbiological aspects, the minceds complied with legal requirements. Sensorially, the tasters detected no difference in the "rancid aroma", only small differences in the product color. It can be concluded that the Minced tilapia, seaweed added, remained within the standards of quality during frozen storage. It should be noted, moreover, the difference in the antioxidant response, according to the method used.

**Keywords:** Tilapia. *Minced*. Seaweed. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Phenolic compounds. Oxidation. TBARS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Tilápias <i>in natura</i> .....	57
Figura 2-	Pré-processamento .....	57
Figura 3-	Obtenção da CMS .....	58
Figura 4-	Lavagem .....	58
Figura 5-	Drenagem .....	58
Figura 6-	<i>Minced</i> de tilápia .....	58
Figura 7-	Ficha para análise sensorial, apresentada aos provadores.....	64
Figura 8-	Aspecto <i>in natura</i> das algas marinhas .....	66
Figura 9-	Extratos etanólicos das algas marinhas .....	67
Figura 10-	Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Wakame .....	69
Figura 11-	Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Hijiki ....	70
Figura 12-	Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Nori .....	71
Figura 13-	Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Kombu .	72
Figura 14-	Concentração fenólica das algas, em relação às extrações consideradas mais eficientes .....	74
Figura 15-	Atividade antioxidante das algas marinhas, pelo método do sequestro de radicais livres DPPH .....	77
Figura 16-	Atividade antioxidante das algas marinhas, pelo método da oxidação acoplada do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico .....	79
Figura 17-	Cromatogramas das algas marinhas Nori e Hijiki, obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência .....	86
Figura 18-	Perfil Cromatográfico, em CG-EM, do extrato etanólico da alga marinha Nori .....	88
Figura 19-	Perfil Cromatográfico, em CG-EM, do extrato etanólico da alga marinha Hijiki .....	90



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Compostos fenólicos totais dos extratos de algas marinhas .....	73
Tabela 2-	Atividade antioxidante dos extratos de algas marinhas, avaliada pelo método do sequestro de radicais livres DPPH .....	76
Tabela 3-	Atividade antioxidante dos extratos de algas pelo método da inibição da oxidação acoplada do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico .....	78
Tabela 4-	Coeficiente de correlação (r) entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante .....	80
Tabela 5-	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos de algas marinhas .....	82
Tabela 6-	Concentração Bactericida Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos de algas marinhas .....	84
Tabela 7-	Compostos identificados e fragmentos dos íons (m/z, em %) do extrato etanólico da alga Nori .....	88
Tabela 8-	Compostos identificados e fragmentos dos íons (m/z, em %) do extrato etanólico da alga Hijiki .....	90
Tabela 9-	Período de indução e fator de proteção das amostras de óleo de soja analisadas no Rancimat .....	95
Tabela 10-	Período de indução (PI), fator de proteção (FP) e extensão de vida útil (EV) das amostras de <i>Minced</i> analisadas no Oxipres ...	96
Tabela 11-	Rendimento da CMS e do <i>Minced</i> de tilápia .....	97
Tabela 12-	Valores médios de $L^*$ para o <i>Minced</i> , durante os 180 dias de armazenamento congelado .....	99
Tabela 13-	Valores médios de $a^*$ para o de <i>Minced</i> , durante os 180 dias de armazenamento congelado .....	100
Tabela 14-	Valores médios de $b^*$ para o <i>Minced</i> , durante os 180 dias de armazenamento congelado .....	101
Tabela 15-	Composição centesimal do <i>Minced</i> de tilápia .....	102
Tabela 16-	Teores de proteína e lipídeos do <i>Minced</i> , durante o tempo de armazenamento .....	102
Tabela 17-	Ácidos graxos em <i>Minced</i> de tilápia (g/100g) .....	104

Tabela 18-	Valores de pH para as amostras de <i>Minced</i> de tilápia .....	106
Tabela 19-	Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (mg N/100g) para o <i>Minced</i> , durante os 180 dias de armazenamento .....	108
Tabela 20-	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico para <i>Minced</i> , durante 180 dias de armazenamento .....	110
Tabela 21-	Coliformes totais e Coliformes a 45 °C (NMP/g) em <i>Minced</i> de tilápia, durante 180 dias de armazenamento congelado .....	113
Tabela 22-	Contagem total em placa de mesófilos e psicotróficos do <i>Minced</i> , durante os 180 dias de armazenamento congelado .....	114
Tabela 23-	Análise sensorial para o atributo “cor”, do <i>Minced</i> de tilápia .....	116
Tabela 24-	Análise sensorial para o atributo “aroma de ranço”, do <i>Minced</i> de tilápia .....	116

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
2.1	Tilápia .....	26
2.2	Carne Mecanicamente Separada e <i>Minced</i> .....	28
2.3	Qualidade do pescado .....	30
2.4	Algas Marinhas .....	34
2.5	Produtos de algas marinhas .....	37
2.6	Atividade antioxidante das algas marinhas .....	39
2.7	Atividade antimicrobiana das algas marinhas .....	42
2.8	Produção e comercialização das algas marinhas .....	43
2.9	Efeito sinérgico de produtos naturais .....	45
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1	Objetivo geral .....	47
3.2	Objetivos específicos .....	47
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
4.1	Material .....	48
4.1.1	Algas .....	48
4.1.2	Tilápias .....	48
4.2	Métodos .....	48
4.2.1	Preparo dos extratos de algas .....	48
4.2.2	Análise da composição química dos extratos de algas .....	49
4.2.2.1	Compostos fenólicos totais .....	49
4.2.2.2	Espectrofotometria na região ultravioleta-visível dos extratos de algas .....	49
4.2.2.3	Comatografia Líquida de Ultra-Eficiência .....	49
4.2.2.4	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM) ...	50
4.2.2.4.1	Derivatização – formação dos derivados do trimetilsilil (TMS) .....	50
4.2.2.4.2	Condições analíticas do sistema CG-EM .....	50
4.2.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos etanólicos das algas .	51
4.2.3.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	51
4.2.3.2	Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	51

4.2.3.3	Sinergismo – Método do tabuleiro .....	52
4.2.4	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos etanólicos das algas .....	53
4.2.4.1	Atividade sequestradora do radical livre DPPH .....	53
4.2.4.2	Inibição da oxidação acoplada do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico .....	54
4.2.5	Atividade antioxidante dos extratos de algas por meio de métodos acelerados .....	54
4.2.5.1	Estabilidade oxidativa em óleo – Rancimat .....	54
4.2.5.2	Estabilidade oxidativa de <i>Minced</i> de tilápia – Oxipres .....	55
4.2.5.2.1	Processamento do <i>Minced</i> .....	55
4.2.5.2.2	Estabilidade oxidativa .....	56
4.2.6	Atividade antioxidante dos extratos de algas aplicados em <i>Minced</i> de tilápia – Estudo da vida útil .....	56
4.2.6.1	Processamento da CMS e do <i>Minced</i> de tilápia .....	56
4.2.6.2	Composição química do <i>Minced</i> de tilápia .....	58
4.2.6.2.1	Teor de umidade .....	58
4.2.6.2.2	Protéina Bruta .....	58
4.2.6.2.3	Lipídeos Totais .....	58
4.2.6.2.4	Perfil e do teor de ácidos graxos .....	59
4.2.6.2.5	Cinza .....	59
4.2.6.3	Cor instrumental .....	59
4.2.6.4	Avaliação do frescor .....	60
4.2.6.4.1	pH .....	60
4.2.6.4.2	Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT) .....	60
4.2.6.4.3	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	61
4.2.6.5	Avaliação microbiológica .....	61
4.2.6.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva .....	61
4.2.6.5.2	<i>Salmonella spp</i> .....	62
4.2.6.5.3	Coliformes totais e termotolerantes a 45 °C .....	62
4.2.6.5.4	Contagem Total de Aeróbios Mesófilos e Psicrotróficos .....	63
4.2.6.6	Análise Sensorial .....	63
4.2.7	Análise Estatística .....	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>

5.1	Algas marinhas .....	66
5.2	Preparação dos extratos etanólicos de algas marinhas .....	67
5.3	Espectros de absorção e teor de compostos fenólicos dos extratos de algas .....	68
5.4	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos de algas marinhas .....	75
5.5	Atividade antimicrobiana dos extratos de algas marinhas .....	81
5.6	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) .....	85
5.7	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM) .....	87
5.8	Atividade antioxidante dos extratos de algas por métodos acelerados .....	93
5.9	Rendimento da extração de CMS e Minced .....	97
5.10	Estudo de vida útil .....	98
5.10.1	Cor instrumental do <i>Minced</i> .....	98
5.10.2	Composição química do <i>Minced</i> .....	101
5.10.3	Frescor do <i>Minced</i> .....	105
5.10.3.1	pH .....	105
5.10.3.2	Bases Nitrogenas Voláteis Totais (BNVT) .....	107
5.10.3.3	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	109
5.10.4	Análise microbiológica do <i>Minced</i> .....	112
5.10.5	Análise sensorial do <i>Minced</i> .....	115
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>118</b>
	REFERENCIAS .....	120
	ANEXOS .....	136



## 1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de pescado aumentou 25% no período de 2002 a 2010, passando de 990.899 t anuais para 1.240.813 t. Houve um crescimento de 15,7%, conforme os dados estatísticos de 2008 e 2009, sendo que a aquicultura apresentou uma elevação de 43,8%, passando de 289.050 t/ano para 415.649 t/ano. A produção da pesca extrativa, tanto marítima quanto continental cresceu, no mesmo período, de 783.176 t para 825.164 t/ano, um aumento de 5,4% (BRASIL, 2011).

A tilápia vem se destacando como uma das espécies mais cultivadas e comercializadas no Brasil. Em 2000, a produção representava 18,4% do total produzido na aquicultura e, em 2004, representava 38% do total, com produção aproximada de 70 mil t (BRASIL, 2005). A criação de tilápia produz hoje, 132 mil t/ano, sendo o “carro chefe” da produção aquícola nacional, uma vez que esta quantidade representa 39% do total de pescado cultivado (BRASIL, 2011).

O aumento na produção de tilápia se deve às características zootécnicas da espécie e da sua adaptação ao clima do país; e vem disponibilizando um alimento de valor nutricional considerável, rico em proteína completa, fonte de aminoácidos essenciais e de ácidos graxos insaturados, além de vitaminas e minerais, o que atrai a atenção dos consumidores, cada vez mais preocupados em manter uma alimentação saudável e equilibrada.

O processamento industrial da tilápia iniciou-se, no Brasil, na década de 1990, no oeste do Paraná, priorizando-se apenas uma forma de beneficiamento, ou seja, filés de tilápia congelados. O rendimento em filé da tilápia é baixo, de 30 a 33% e, conseqüentemente, gera uma grande quantidade de resíduos (OETTERER, 2002). Tradicionalmente, os resíduos da filetagem ou de outros processos de conservação de pescado são destinados à produção de farinha de peixe para alimentação animal ou são descartados na rede pública, gerando problemas ambientais e perdas econômicas. Uma alternativa simples para o aproveitamento destes resíduos tem sido a elaboração de silagem e sua posterior utilização na alimentação animal. No entanto, na carcaça restante após a filetagem sobram ainda partes comestíveis de boa qualidade que podem ser utilizados para a alimentação humana (FERRAZ DE ARRUDA, 2004; KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

A aplicação de um processo de extração de Carne Mecanicamente Separada (CMS) tem se destacado como um processo atraente, principalmente pela possibilidade de maior recuperação da carne, gerando matéria-prima básica e versátil para o desenvolvimento de co-produtos. A tecnologia de obtenção de CMS gera produtos diversificados, a partir do *Minced*, como o *Surimi*, *Kamaboko*, *Hamburguer*, embutidos, entre outros (FAO/WHO, 1994).

O *Minced* é definido pelo *Codex Alimentarius* como o produto obtido a partir de uma ou várias espécies de peixes com características sensoriais similares, submetido ao processo de separação mecânica, resultando em partículas de tecido muscular isentas de ossos, vísceras e pele (FAO/WHO, 1994). No entanto, o processo de separação mecânica gera uma maior superfície de contato no produto, tornando-o vulnerável, podendo sofrer em curto espaço de tempo alterações de natureza física, química e microbiológica. O desenvolvimento de novas formulações que visem melhorar a qualidade tecnológica do *Minced* torna-se necessária e pode ser alcançada por meio do uso de ingredientes conservantes (OETTERER, 2002).

O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante surgiu pela necessidade de se buscar novos aditivos em substituição aos sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), os quais mostravam alterações enzimáticas e lipídicas em animais e potencialmente efeitos carcinogênicos (ROCHA et al., 2007). Sendo assim, as pesquisas mais recentes têm sido conduzidas para substituir os aditivos químicos usados nos produtos cárneos, inclusive de pescado, por produtos não-sintéticos, tais como a casca e a semente da uva, a semente da framboesa e o alecrim (TANG et al., 2001; MEDINA et al., 2003; MONTERO et al., 2005; LUTHER et al., 2007; NIELSEN; DEBNATH; JACOBSEN, 2007; SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2007; SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2008).

No Brasil, as pesquisas com produtos naturais de origem marinha, particularmente as algas, tiveram início na década de 1960. A descoberta de metabólitos com atividades biológicas provenientes de algas aumentou, significativamente, nas últimas décadas (WANG et al., 2009). Assim, a maioria das informações disponíveis refere-se à composição química. Há, portanto, um potencial de pesquisa para a área, principalmente com relação às atividades biológicas e aplicabilidade dessas algas como agentes antioxidantes e antimicrobianos (PINTO et al., 2002).

O presente projeto pretende avaliar a composição química e a atividade biológica de algumas espécies comestíveis de algas marinhas, em função da atividade antimicrobiana e antioxidante que possam exercer, quando aplicadas ao *Minced* elaborado com tilápia, visando prolongar a vida útil e manter a qualidade nutricional e sensorial deste produto.

Novos procedimentos tecnológicos visando aumentar a qualidade do *Minced* e, conseqüentemente, dos produtos à base de tilápia são necessários para que seja possível consolidar a industrialização desta espécie, mediante a vulnerabilidade da matéria-prima e possível perecibilidade. Pela sua qualidade nutricional e funcionalidade, os alimentos de origem aquática são promotores da saúde e da melhoria da qualidade de vida. No entanto, a única maneira de manter e disponibilizar ao consumidor benefícios nutricionais é através do desenvolvimento de produtos voltados à priorização dos aspectos nutricionais, garantindo que os nutrientes presentes no pescado não se percam no processamento e, em complemento aos anseios do atual consumidor, utilizando aditivos naturais.

Produtos com valor agregado podem ser destinados à exportação, o que representa um relevante impulso na exploração comercial e industrial do pescado no Brasil. Além disso, o estudo de produtos naturais marinhos como fonte de princípios bioativos, poderá propiciar o conhecimento de novos ingredientes funcionais para uso na indústria alimentícia e a geração de patentes brasileiras com algas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Tilápia

Nos últimos anos houve um avanço considerável nas pesquisas envolvendo o pescado. De uma maneira geral, este produto está sendo cada vez mais demandado em todo o mundo, ato que tem sido aconselhado por especialistas da área, pois o pescado possui qualidades para combater, ao mesmo tempo, dois flagelos contemporâneos, a fome e a obesidade, pelos componentes saudáveis disponíveis em abundância na sua composição (PIEDADE, 2007).

Dados publicados pela Organização das Nações Unidas e Organização para Agricultura e Alimentação (FAO, 2010) indicaram que a produção pesqueira mundial, em 2006, foi de aproximadamente 140.000.000 t e a produção de tilápias posicionou-se ao redor de 2.000.000 t. No Brasil, segundo publicação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, a produção de pescado, em 2006, foi de 1.000.050 t, e a aquicultura foi responsável pela produção de 272.000 t, sendo a produção total de tilápia de 80.500 t (BRASIL, 2007).

O pescado produzido pela aquicultura corresponde a mais de um quarto de todo o pescado diretamente consumido pelos humanos. A aquicultura proporcionou 47% do abastecimento mundial de pescado para alimentação, em 2006 (FAO, 2010). A piscicultura continental brasileira tem mostrado um sólido e constante crescimento, com a produção, em 2003, de 177.125 t e em 2009, atingindo valores de 337.353 t (BRASIL, 2011).

A tilápia é a segunda espécie de maior importância na aquicultura mundial e a primeira em volume de produção no Brasil (BRASIL FOOD TRENDS, 2010), com boa aceitação no mercado consumidor, destacando-se em cultivos, por apresentar crescimento rápido e rusticidade. De acordo com a estatística da produção pesqueira de 2008 e 2009, publicada pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2011), a produção de tilápia no Brasil apresentou um padrão de crescimento contínuo desde 1994. Entre os anos de 2003 a 2009, a produção de tilápia cresceu 105%, de 64.857,5 t para 132.957,8 t. Um aumento significativo de produção ocorreu em 2002, quando houve um acréscimo de 59% em relação a

2001; em 2007, a produção aumentou 33% em relação ao ano anterior. Entre 2006 e 2009, a produção aumentou 86%, chegando a ultrapassar 130 mil t. De 2007 a 2008 houve crescimento de 17%, de 95.091 t para 111.145,3 t, respectivamente. De 2008 a 2009, houve um crescimento de 20% na produção, chegando a 132.957,8 t. A produção de tilápia representa 39% do total proveniente da piscicultura continental.

As tilápias pertencem aos gêneros *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. A maioria, das cerca de 70 espécies de tilápias catalogadas, é originária da África. No entanto, apenas 4 espécies se destacam na aquicultura mundial, todas do gênero *Oreochromis*: tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), tilápia azul ou áurea (*Oreochromis aureus*) e tilápia de Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornorum*) (KUBITZA, 2000).

O Brasil apresenta um dos mais baixos índices de consumo de pescado, o que se deve, provavelmente, entre outros fatores, à falta de conhecimento da importância deste item na alimentação. O baixo consumo está ligado a fatores culturais e níveis de renda (MARENGONI et al., 2009).

A tilápia do Nilo se destaca das demais pelo rápido crescimento, reprodução tardia, o que permite alcançar maior tamanho antes da primeira reprodução, e produção de grande volume de alevinos. A sua tolerância ao frio é intermediária, cujas temperaturas mínimas letais variam de 8 a 13°C (KUBITZA, 2000).

A tilapicultura firmou-se como atividade empresarial a partir da década de 1980, quando surgiram os empreendimentos pioneiros. Estes foram inicialmente limitados por vários tipos de restrições como o conhecimento incipiente das técnicas de cultivo, inexistência de rações adequadas e baixa qualidade dos alevinos, entre outras. O Paraná foi o primeiro estado brasileiro a organizar a atividade de forma racional, inclusive com a implantação de frigoríficos especializados em beneficiamento de tilápia, com destaque para os municípios de Toledo e Assis Chateaubriand (FIGUEIREDO JÚNIOR; VALENTE JÚNIOR, 2008; SAVAY DA SILVA, 2009).

O processamento industrial de tilápia no Brasil iniciou-se na década de 1990, na região Oeste do Paraná, priorizando-se apenas uma forma de beneficiamento, a filetagem, com rendimento de 32,2% (MINOZZO; WASZCZYNSKYJ; BOSCOLO, 2008).

Dentre as principais espécies de peixes cultivadas, as tilápias se destacam pela carne de excelente qualidade. Em síntese, a tilápia apresenta carne com

poucos “espinhos”, de cor branca, textura firme e aspecto succulento. Estas características tornam este peixe uma boa escolha aos “gourmets”, ou seja, ajusta-se aos mais diferentes tipos de temperos e formas de preparo e apresentação.

Gryschek, Oetterer e Gallo, (2003) e Savay da Silva (2009) determinaram, respectivamente, que o filé de tilápia possui 78,43% e 76,23% de umidade; 3,47 e 1,99% de lipídeos, 18,07% e 17,08% de proteína e 0,96% e 1,09% de minerais. A variação em lipídeos pode ser entendida como função da sazonalidade.

Peixes de água doce geralmente contêm porções menores de ácidos graxos poliinsaturados em comparação aos marinhos (ANDRADE et al., 1995). O pescado de água doce tem a composição em ácidos graxos sensível ao tipo de alimentação de que dispõe, apresentando larga variação qualitativa e quantitativa em ácidos graxos (MARTINO; TAKAHASHI, 2001).

## **2.2 Carne Mecanicamente Separada e *Minced***

O resíduo gerado pelas plantas beneficiadoras de pescado, principalmente na filetagem da tilápia, representa entre 50 e 70% da matéria-prima, sendo fundamental o aproveitamento deste material para a redução do impacto ambiental. O apreciável volume de resíduos torna-se um problema crucial que interfere na sustentabilidade da cadeia produtiva do pescado cultivado. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material residual pode ser convertido em produtos comerciais ou matéria-prima para processos secundários. O aproveitamento desse material que seria desperdiçado é de extrema importância, pois além de diminuir os custos e aumentar a eficiência de produção, também minimiza os problemas de poluição ambiental que seriam gerados pela falta de destino adequado (SUCASAS, 2011).

Na indústria pesqueira, a aplicação da técnica de separação mecânica da carne (CMS) tem sido uma das alternativas oferecidas para a diversificação de seus produtos, permitindo a elaboração de uma variada linha de produtos, tais como *fishburger*, salsichas e *nuggets* (SIDDAIAH, 2001).

Vários termos são utilizados para definir a CMS de pescado, como *Minced*, polpa de pescado, cominutado ou cominuído de pescado, carne de pescado desossado, entre outros. No entanto, nenhum deles expressa mais adequadamente

o produto e a técnica de sua obtenção quanto o termo *minced*, pois o produto não deve ser entendido apenas como uma carne moída de pescado (NEIVA, 2008).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 1994), a CMS é obtida por separação mecanizada da parte comestível, gerando segmentos de músculos isentos de vísceras, escamas, ossos e pele, e posteriormente, submetidos ou não a uma ou mais lavagens, objetivando a melhoria da qualidade sensorial do produto. A CMS pode ser obtida a partir de uma espécie ou mistura de espécies de pescado com características sensoriais similares, e ainda, ser proveniente da parte comestível restante da carcaça após a filetagem. O equipamento separa o músculo através da prensagem da massa cárnea contra um cilindro perfurado.

O *Minced* possibilita à indústria maior flexibilidade nos processos de industrialização, gerando produtos diversificados, cujo rendimento em carne é superior ao obtido no processamento de filés, para o qual o mercado está atualmente direcionado. Para o produtor, a vantagem está no escoamento rápido da sua produção, mesmo com os peixes estando com diferentes tamanhos ou em fases distintas de crescimento. Para o consumidor, está na aquisição de um produto com qualidade e valor nutritivo, apresentando proteína de alto valor biológico, presença de aminoácidos essenciais e ácidos graxos poliinsaturados (OETTERER et al., 2004; ANGELINI, 2010).

O objetivo da lavagem da CMS utilizando baixas temperaturas é remover parcial ou totalmente as proteínas sarcoplasmáticas, pigmentos, sangue e lipídeos, que favorecem a oxidação lipídica. Esse procedimento melhora a qualidade e mantém as características funcionais do produto. Porém, de acordo com Jesus, Lessi e Tenuta-Filho (2003), a intensa lavagem da CMS pode provocar perdas excessivas de proteínas e de componentes solúveis.

A relação água: peixe, o tempo de contato entre ambos, e o número de ciclos de lavagem a serem usados dependerão do tipo de matéria-prima e do nível de remoção necessários para atender aos requisitos de qualidade do produto final. Após o processo de lavagem, o excesso de água é retirado por meio de prensagem ou centrifugação, até que o produto tenha teor de umidade em torno de 80 a 84% (KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

A grande vantagem da produção de *Minced* está relacionada com a maior rentabilidade das indústrias, por permitir maior rendimento da carne e de sua utilização na elaboração de uma vasta linha de produtos como *fishburger*,

salsichas, linguiças, empanados, almôndegas, patês, entre outros (BOMBARDELLI; SYPPERRECK; SANCHES, 2005).

### 2.3 Qualidade do pescado

Qualidade como um todo envolve a soma dos atributos físico-químicos, sensoriais e microbiológicos de um alimento e, no caso do pescado, a qualidade está estreitamente ligada com o estado de frescor (CONTRERAS-GUZMÁN, 1988).

O mercado está cada vez mais exigente no que diz respeito à segurança do alimento, bem como na maneira pela qual o alimento é produzido. Surgiram novas variáveis que diferenciam os produtos, dando prioridade àqueles que são obtidos sob determinadas regras, como o fato de serem provenientes de cadeias produtivas ambientalmente corretas, socialmente justas e economicamente viáveis (PIRES, 2007; ANGELINI, 2010).

A indústria alimentícia tem aumentado seus investimentos em tecnologia e mão de obra qualificada, com o intuito de oferecer ao consumidor produtos com maior valor agregado, práticos, saborosos, com vida útil estendida e principalmente, nutritivos (RUIZ, 2011). Este fato se deve, principalmente, à tendência da sociedade moderna em preferir o consumo de produtos semi-prontos ou prontos, de alta qualidade e maior diversidade.

Dentre os produtos cárneos, o pescado é o mais susceptível às alterações *post mortem* que podem afetar a qualidade nutricional e sensorial. A rapidez em deteriorar se deve à rápida ação enzimática, à característica menos ácida da carne e à facilidade de oxidação dos lipídeos insaturados (ANGELINI, 2010).

Durante o processo de deterioração da carne ocorre uma série de alterações bioquímicas que acompanham o metabolismo *post mortem* e promovem condições para que o processo de oxidação se instale. Estas alterações favorecem o desenvolvimento da oxidação da fração fosfolipídica altamente insaturada nas membranas celulares, uma vez que é improvável que os mecanismos de defesa das células do animal vivo ainda funcionem perfeitamente após o abate (MORRISSEY et al., 1998).

A taxa e a extensão da deterioração oxidativa depende de fatores como o período e temperatura de armazenamento, grau de saturação dos ácidos graxos,

presença de oxidantes e pró-oxidantes e disponibilidade de oxigênio (PIEADADE, 2007).

O frescor do pescado pode ser avaliado por métodos sensoriais, microbiológicos e físico-químicos. Devido à subjetividade dos métodos sensoriais e à demora para execução de testes microbiológicos, métodos químicos que quantifiquem os componentes provindos da atividade enzimática e bacteriana têm sido desenvolvidos para avaliar o frescor do pescado. Muitos índices químicos estão baseados nas alterações quantitativas ou qualitativas de compostos da fração nitrogenada não protéica do músculo do pescado. A detecção de alterações progressivas destas substâncias no músculo do pescado, durante o armazenamento é o primeiro requisito para considerar tais substâncias como potenciais índices de frescor (LAPA-GUIMARÃES, 2005; SAVAY DA SILVA, 2009).

O congelamento é um dos melhores métodos de conservação dos alimentos, já que quando adequadamente conduzido, inibe a deterioração microbiana, reduz a velocidade das reações químicas, bem como, a ação de enzimas e ao mesmo tempo, conserva o sabor, o aroma, a cor e o valor nutritivo dos alimentos, além de causar alteração mínima na textura após o descongelamento (OETTERER, 2002).

A estocagem sob congelamento não interrompe completamente todas as possíveis alterações na qualidade da CMS e do *Minced*. As reações que induzem as alterações oxidativas e a desnaturação protéica continuam a ocorrer, mesmo em baixas temperaturas, porém em menor velocidade (KUHN; SOARES, 2002). A incorporação de antioxidantes e de crioprotetores nas CMS e *Minced* podem melhorar a estabilidade durante o congelamento (TENUTA-FILHO; JESUS, 2003; KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de doenças, desencadeadas por microrganismos patogênicos e suas toxinas (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

A qualidade do pescado e seus produtos pode ser alterada diretamente pelos hábitos não-higiênicos dos manipuladores, pelas superfícies contaminadas das bancadas e mesas ou ainda pelos utensílios não sanificados, fatores que determinam uma condição de risco ao pescado, somados à contaminação do ambiente onde é capturado (ALBUQUERQUE; VIEIRA; VIEIRA, 2006).

É sabido que o gelo utilizado na conservação do pescado, ou de qualquer outro tipo de alimento, deve ser de ótima qualidade, em relação ao seu aspecto microbiológico, pois a qualidade dele afetará diretamente a qualidade do produto (FALCÃO et al., 2002).

O *Staphylococcus aureus* é um agente etiológico de infecções adquiridas tanto na comunidade em geral, como em ambientes hospitalares. É um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar, bem como por um alto índice de mortalidade, frequentemente envolvido em casos de resistência a antibióticos. As peculiaridades do seu *habitat* tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, podendo ser transmitido aos alimentos por manipuladores que sejam portadores (FARIAS et al., 1997).

A *Salmonella* está associada a áreas intestinais de animais de sangue quente. Alguns estudos detectaram este microrganismo em intestino de carpa e tilápia (HUSS; REILLY; EMBAREK, 2000). O aumento da incidência de salmonelose provocada por alimentos contaminados demonstra que, apesar dos avanços tecnológicos, este problema persiste.

As bactérias presentes no pescado tropical tendem a um comportamento mesofílico. A microbiota mesofílica é pouco adaptada à multiplicação em temperatura de refrigeração e tem uma menor produção de compostos de degradação, bem como uma atividade metabólica diferente daquela psicrófila. Assim, a deterioração, especialmente em pescado conservado a baixas temperaturas, é causada, principalmente, por bactérias psicrófilas. Os processos de deterioração não serão perceptíveis até que os microrganismos psicrófilos tenham se multiplicado em níveis capazes de produzir maus odores (VIEIRA, 2003; SAVAY DA SILVA, 2009).

O grupo de coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 28 h, a 35 °C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*, por exemplo. Por essa razão, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes ou *Escherichia coli* (SILVA et al., 2010).

Segundo a Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 (BRASIL, 1997a), aditivo é qualquer ingrediente adicionado ao alimento, sem propósito de nutrir, com objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas e sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação ou manipulação de um alimento.

Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é inibida por aditivos sequestradores de radicais livres. Neste caso, os compostos mais utilizados, entre outros, são: BHT (butil-hidroxi-tolueno), BHA (butil-hidroxi-anisol), TBHQ (terc-hidroxi-butilfenona) e PG (Propil galato). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de esses antioxidantes apresentarem efeito tóxico, e o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) têm alterado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de algumas pesquisas científicas (SOARES, 2002).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos.

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de substituir os aditivos sintéticos por produtos naturais, tais como, a casca e semente da uva, a semente da framboesa e o alecrim (TANG et al., 2001; MEDINA et al., 2003; MONTERO et al., 2005; LUTHER et al., 2007; NIELSEN; DEBNATH; JACOBSEN, 2007; SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2007; SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2008). Estes autores têm encontrado resultados interessantes que instigam a continuação das pesquisas nesta linha, bem como sugerem novas pesquisas com outros produtos naturais.

Sant’Ana e Mancini Filho (1999) estudaram a influência da adição de antioxidantes naturais, no caso, extrato de alecrim, na composição de ácidos graxos de “polpa” do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Os resultados mostraram que o uso de antioxidantes não alterou a composição de ácidos graxos em comparação ao controle. O teste de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) confirmou o importante papel do extrato de alecrim na inibição da oxidação lipídica.

Serdaroglu e Felekoglu (2005) demonstraram que o extrato de alecrim a 300 µg/mL retardou a oxidação no *Minced* de sardinha. O extrato de cebola, na concentração de 100g/mL, não foi tão efetivo quanto o extrato de alecrim.

## 2.4 Algas Marinhas

As algas são os organismos aquáticos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano, há 3,5 bilhões de anos. As algas, por serem organismos fotossintetizantes, são responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, possibilitando a vida sobre a superfície do planeta de todos os seres vivos aeróbicos, pela produção de oxigênio molecular e consequente formação da camada de ozônio, que filtra os raios UV. São organismos eucariotos que possuem clorofila *a* e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas. No ambiente aquático, as algas podem fazer parte dos bentos, que são indivíduos fixos no substrato, ou do plâncton, composto por indivíduos suspensos na água (HORTA, 2000).

As algas marinhas possuem importância tanto do ponto de vista econômico, como ambiental e social. As algas mantêm o equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, propiciando a continuidade da fauna existente, que pode ser utilizada pela humanidade como fonte de alimento. Algumas espécies são utilizadas como indicadores para a avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos, para os quais, inclusive, já foi sugerido um “índice de poluição” baseado nos gêneros de algas presentes; quanto menos diversificada a população, maior a poluição do sistema (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). As macroalgas marinhas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais como parte importante de sua dieta alimentar. Elas têm um grande significado social e econômico em vários países da Ásia, que respondem por até 98% da produção mundial de algas (ROCHA, 2001).

Atualmente, os produtos explorados comercialmente e provenientes das algas são os seguintes: alginatos, o ácido manurônico e ácido gulurônico, contendo polímeros a partir de algas pardas; ágar, a D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, contendo polímeros que são isolados a partir de algas vermelhas, e carragenanas (CAMPO et al., 2009).

A heterogeneidade dos organismos encontrados no grupo das algas é grande. As três divisões de algas, inteira ou parcialmente multicelulares

compreendem as algas vermelhas (Rhodophyta), as algas pardas (Phaeophyta) e as algas verdes (Chlorophyta) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Os gêneros mais importantes são *Porphyra*, *Chondrus*, *Rhodymenia*, *Hypnea*, *Gracilaria*, *Laurencia*, *Iridae* (vermelhas); *Undaria*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Sargassum*, *Turbinaria* (pardas); *Ulva*, *Enteromorpha*, *Monostroma* e *Gaulerpa* (verdes) (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009).

A composição química das diferentes algas demonstra que, em geral, todas apresentam valor nutricional satisfatório, sendo fontes de proteínas, carboidratos, fibras, minerais, vitaminas, além de possuírem a vantagem de ser pouco calóricas e ter baixo teor de gordura. São excelentes fontes de vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub>, C, D e E, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e ácido fólico, e minerais, tais como, Ca, P, Na e K (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009).

Como os outros alimentos de origem vegetal, as algas marinhas contêm todos os tipos de vitaminas e correspondem a uma fonte natural desses nutrientes para o homem. Possuem provitamina A e vitaminas B e C, tanto quanto frutas, verduras e legumes comestíveis. As algas também podem ser uma fonte interessante de novos compostos com atividade biológica que poderiam ser utilizadas como ingredientes funcionais.

SOUSA et al. (2008) estudaram 32 espécies de algas marinhas das divisões Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta como fontes de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol. Neste estudo, com relação aos carotenóides, provitamina A e vitamina E, os maiores teores foram encontrados nas algas verdes, seguidas pelas pardas e vermelhas.

Campos, Barbarino e Lourenço (2010) cultivaram 10 espécies de microalgas marinhas de diferentes grupos taxonômicos e compararam o seu crescimento e a sua composição química. Neste estudo, foram observadas diferenças na velocidade de crescimento, com espécies de células menores crescendo mais rapidamente que microalgas maiores. Teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos fotossintetizantes variaram amplamente entre as espécies, sendo as proteínas as substâncias mais abundantes. Todas as espécies apresentaram concentrações de aminoácidos semelhantes, sendo os ácidos aspártico e glutâmico os mais abundantes. Algumas espécies apresentaram altas concentrações de ácidos graxos de importância econômica, como os ácidos eicosapentaenoico e linoleico. Entretanto, é interessante mencionar que a presença desses compostos pode ser

influenciada pelos parâmetros de crescimento, tais como a temperatura da água de cultivo, salinidade, luz e nutrientes.

Algas marinhas contêm uma quantidade significativa de polissacarídeos solúveis (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2010). Segundo os autores, a maioria não é digerida pelos seres humanos, cujo trato gastrointestinal não produz as enzimas necessárias para a sua degradação e, portanto, estes polissacarídeos podem ser considerados como fibras dietéticas.

Segundo Kadam e Prabhasankar (2010), os polissacarídeos de algas possuem uma maior capacidade de retenção de água do que as fibras celulósicas. O interesse em hidrocolóides de algas para a nutrição humana ocorre devido à sua atuação como fibra dietética; o seu efeito fisiológico está intimamente relacionado com suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, viscosidade, hidratação e capacidade de troca iônica no aparelho digestivo.

As algas são fontes de fitoquímicos biologicamente ativos, que incluem carotenóides, ficobilinas, ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas, esteróis de tocoferol, ficocianinas, entre outros. Muitos destes compostos apresentam atividade biológica e, são, portanto, benéficos à saúde humana e animal. Alguns dos benefícios potenciais estão no controle da hiperlipidemia, trombose, tumores e obesidade (PLAZA; CIFUENTES; IBANEZ, 2008).

As algas podem estar associadas a um estágio evolutivo superior, levando à produção de metabólitos secundários diversificados e, conseqüentemente, à expressão de inúmeras atividades biológicas. Essas algas são capazes de sintetizar metabólitos halogenados que podem pertencer a praticamente todas as classes químicas, desde hidrocarbonetos de baixo peso molecular, cetonas, fenóis, acetogeninas, até complexos terpenos (CARVALHO; ROQUE, 2000).

As algas marinhas pardas e verdes são menos eficientes na produção de substâncias halogenadas, sendo que ambas, e particularmente as pardas, apresentam polissacarídeos sulfatados (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1997).

Como defesas químicas, as algas produzem acetogeninas, terpenos, derivados de aminoácidos, fenóis simples e polifenóis, substâncias que diferem dos produtos de plantas por serem frequentemente halogenados (CARVALHO; ROQUE, 2000).

Os fenóis bromados são substâncias muito estudadas em algas marinhas. O lanosol (éter metílico do álcool 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzílico) está entre os

bromofenóis mais amplamente distribuídos e é encontrado tanto em micro quanto em macroalgas. Este composto, de acordo com a literatura, apresenta efeito algicida, antiinflamatório e antibiótico (CARVALHO; ROQUE, 2000). Derivados halogenados do ácido hidroxibenzóico e ésteres do ácido cinâmico também foram encontrados em algas (ONOFREJOVÁ et al., 2010). Uma série de compostos fenólicos, tais como catequinas, flavonóis e flavonóis glicosilados foram identificados em extratos metanólicos de algas vermelhas e pardas (SANTOSO; YOSHIE; SUZUKI, 2002; YOSHIE-STARK; HSIEH; SUZUKI, 2003).

Os florotaninos, um grupo de compostos fenólicos, que são restritos a polímeros do floroglucinol, têm sido identificados em algumas famílias de algas pardas, tais como Alariaceae, Fucaceae e Sargassaceae. Os estudos têm mostrado que os florotaninos são o único grupo fenólico detectado em algas pardas (KOIVIKKO et al., 2008).

No Brasil, as pesquisas com produtos naturais de origem marinha, particularmente as algas, tiveram início na década de 1960, quando houve um grande investimento por parte das indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas, a partir dos organismos que vivem nos oceanos. A química de produtos naturais marinhos, embora fosse incipiente na década de 1970, apresentou desenvolvimento rápido nos anos seguintes (FAULKNER, 2000). No entanto, a maioria das informações científicas refere-se à composição química e à aplicabilidade desses organismos, muitos dos quais são espécies endêmicas. Devido à grande diversidade de espécies, há, portanto, um grande potencial de pesquisa para a área, principalmente com relação às atividades biológicas apresentadas pelas algas (PINTO et al., 2002).

## **2.5 Produtos de algas marinhas**

O consumo de algas está sujeito à regulamentação específica e o conhecimento dos detalhes de sua composição química e as variações entre as espécies é necessário para obtenção de autorização para seu uso na alimentação humana. A França foi o primeiro país europeu a estabelecer regulamentação específica sobre o uso de algas marinhas para consumo humano. Na Espanha, a partir de 1978, as algas foram consideradas como novos alimentos e foram incluídas

no grupo de “vegetais enlatados”, pois na ocasião não havia regulamentação específica para os produtos derivados de algas e seu consumo era limitado (ESPANHA, 1978).

As algas vermelhas são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados, como as carragenas e o ágar, que chegam a representar mais de 70% do seu peso e têm razoável valor comercial (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1997).

A carragena é um hidrocolóide usado na produção de alimentos, principalmente nas indústrias de laticínios, para a elaboração de iogurtes, *flans*, sorvetes, achocolatados e na indústria cárnea para a preparação de embutidos, como salsichas e presunto. É empregada na fabricação de gelatinas e geléias e como espessante em molhos e sopas (ESTUDO, 2011). Também são encontradas diversas aplicações na indústria farmacêutica, como anticoagulantes e antiinflamatórios bem como, em indústrias têxteis, de tintas e de perfumes (ARMISEN, 1995). A macroalga *Kappaphycus alvarezii* tem sido cultivada em larga escala para suprir a carragena nas indústrias alimentícias. Várias atividades biológicas têm sido descritas para a carragena, tais como antitumoral, antiviral, anticoagulante e imunomodulatória (ZHOU et al., 2004; ZHOU et al., 2005).

Carragenas são polissacarídeos sulfatados lineares de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose, extraídas de certas algas vermelhas da classe Rhodophyceae. Eles têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia, como espessantes e geleificantes e, mais recentemente, na indústria farmacêutica como excipiente em comprimidos. Além das atividades biológicas conhecidas, relacionadas com a inflamação e as respostas imunes, carragenanas são potentes inibidores do vírus da herpes e do vírus do papiloma humano (HPV) e há indícios de que estes polissacarídeos podem oferecer alguma proteção contra a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Segundo alguns autores, a carragena é ativa contra o HIV somente em concentrações 100 vezes maiores que as necessárias para inibir papilomavírus (BUCK et al., 2006). No entanto, as carragenas podem servir como modelos para projetar novos agentes anti-HIV e que apresentem propriedades terapêuticas melhoradas (CAMPO et al., 2009).

Na indústria alimentícia, as carragenas são largamente utilizadas devido às propriedades físico-funcionais que apresentam. Atuam como espessante, gelificante e estabilizante, melhorando, por exemplo, a textura do queijo *cottage*. Controlam a viscosidade e a textura de doces e sobremesas, além de atuar como aglutinantes e

estabilizadoras na indústria de embutidos de carne, salsichas, e no processamento de hambúrgueres com baixo teor de gordura (CAMPO et al., 2009).

O uso em alimentos responde por 70 a 80% da produção mundial total de carragenas, de cerca de 45 mil toneladas métricas por ano; 45% se destinam aos produtos lácteos e 30% aos carnes. O mercado total de carragenas foi estimado, em 2003, como sendo de US\$ 300 milhões / ano, nos Estados Unidos da América (MCHUGH, 2003).

O ágar é uma galactana sulfatada e sua qualidade depende das características físico-químicas, de parâmetros ambientais, crescimento e ciclo reprodutivo da alga (DAUGHERTY; BIRD, 1988). O ágar de baixa qualidade é usado em produtos alimentícios congelados, sucos de frutas e sobremesas. Outras aplicações industriais incluem adesivos e tintas. O ágar de média qualidade é usado como substrato em meios de cultura bacteriológicos; também são importantes na indústria médica e farmacêutica, na fabricação de supositórios, cápsulas e anticoagulantes. Os tipos mais purificados, ou seja, as frações neutras ou agaroses são usadas para separação em técnicas de biologia molecular, como eletroforese, imunodifusão e cromatografia em gel (CARDOZO et al., 2007).

As algas pardas são utilizadas na alimentação humana e também como fertilizantes, sendo importantes fontes de ácidos algínicos ou alginatos, cujas propriedades coloidais são empregadas na farmacologia para fabricação de pomadas e suspensões. Os alginatos são utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica devido a sua habilidade de quelar íons metálicos e formar uma solução altamente viscosa (YAMASAKI et al., 2005).

## **2.6 Atividade antioxidante das algas marinhas**

Embora a maioria das plantas que realizam fotossíntese, incluindo as algas, estejam expostas a uma combinação de fatores como altas concentrações de oxigênio e luz intensa, que levam à formação de radicais livres e outros agentes oxidantes potentes, as algas raramente sofrem algum dano oxidativo grave *in vivo* (AHN et al., 2004).

Segundo Raimundo, Horta e Fett (2004), apesar do elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, as algas demonstram estabilidade frente à oxidação durante seu armazenamento. As algas são continuamente submetidas a rápidas variações

de intensidade de luz e concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, fatores que se associados originam radicais livres, assim como outros potentes oxidantes. Assim, a ausência de danos oxidativos e sua sobrevivência dependem de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo. Por essa razão, esses organismos podem se constituir em fonte de substâncias antioxidantes naturais, tanto para a indústria alimentícia, como para a farmacêutica (MATSUKAWA et al., 2007).

A definição mais aceita para antioxidantes relata que estes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação (SIES; STHAL, 1995). Vários componentes fisiológicos são conhecidos pela capacidade de inativar ou neutralizar radicais livres, dentre eles estão vários metabólitos secundários provenientes de produtos naturais (PIETTA, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante em algas surgiu no Japão, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição aos antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (ROCHA et al., 2007). Estes compostos podem apresentar prováveis efeitos carcinogênicos, em função de provocarem alterações enzimáticas e lipídicas em animais. Desta forma, a pesquisa por antioxidantes naturais em substituição aos antioxidantes sintéticos, é objeto de estudo de muitos pesquisadores. Entretanto, há algumas desvantagens no uso de alguns produtos naturais como os carotenóides, compostos fenólicos e vitamina E, pelo fato destes componentes serem insolúveis em água e, embora a vitamina C seja hidrossolúvel é sensível ao aquecimento e facilmente desnaturada.

O fato da alga desidratada e armazenada por um longo período não sofrer oxidação, mesmo apresentando mais de 30% do total de seus ácidos graxos na forma poliinsaturada, despertou o interesse dos pesquisadores em relação ao seu mecanismo antioxidante (ROCHA et al., 2007).

Ahn et al. (2004) investigaram a atividade do sequestro de radical livre pelo método do difenilpicrilidrazila (DPPH) em extratos solúveis em água, obtidos pela hidrólise enzimática, via proteases e carboidrases, de algas pardas da espécie *Scytosiphon lomentaria*. Neste estudo, os autores não encontraram atividade antioxidante satisfatória nos extratos hidrolisados de algas marinhas, e salientaram que, apesar da vantagem da solubilidade em água, há a necessidade de maiores estudos para viabilizar o uso desses tipos de extratos como antioxidantes naturais.

As macroalgas são similares às plantas terrestres no que concerne à produção de substâncias genericamente denominadas de metabólitos secundários, tais como terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas, derivados de aminoácidos e, principalmente, os polifenóis (halogenados e sulfatados). Estes compostos conferem às algas uma expressiva atividade antioxidante, descrita em várias pesquisas. Nagai e Yukimoto (2003) avaliaram a atividade antioxidante de bebidas preparadas com quatro espécies de algas, comuns na culinária japonesa, a saber, *Ecklonia cava* (trombeta-do-mar), *Undaria pinnatifida* (wakame), *Hizikia fusiforme* (hizikia) e *Ulva pertusa* (alface-do-mar). Os autores descreveram que as algas possuem um bom potencial antioxidante, sendo a *Ecklonia cava* a mais eficiente. Houve uma correlação positiva entre o teor de polifenóis e a atividade antioxidante expressa para cada alga estudada.

A avaliação *in vivo* da atividade antioxidante de uma galactana sulfatada proveniente de uma fração da alga vermelha *Porphyra haitanensis* demonstrou expressiva atividade, após administração intraperitoneal em ratos. Houve diminuição significativa da peroxidação lipídica, além do aumento da capacidade antioxidante e da atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase (ZHANG et al., 2004).

O efeito antioxidante de quatro espécies de algas do filo Chlorophyta foi avaliado por meio da inibição da peroxidação do ácido linoléico, em emulsão. Os autores indicaram que as espécies mais efetivas foram *Enteromorpha intestinalis* e *Chaetomorpha antennina*, com porcentagens de inibição acima de 70%. Além disso, o teor de compostos fenólicos foi medido, sendo encontrados valores de 610,31 mg/100g e 635,53 mg/100g, respectivamente (RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004).

*Palmaria palmata* (dulse) teve seu teor de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante avaliada por Yuan, Bone e Carrington (2005). Foi encontrado um teor de 10,3 µg de compostos fenólicos/mg de extrato da alga e alta atividade antioxidante quando empregados os métodos de sequestro de radical DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico); e inibição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os autores associaram a atividade a compostos solúveis em soluções de álcool/água, caracterizadas por grupamentos funcionais fenólicos.

Duan et al. (2006) determinaram a atividade antioxidante de extratos de *Polysiphonia urceolata* pelos métodos de sequestro de radical livre DPPH e sistema

$\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Os resultados demonstraram alta atividade antioxidante desta alga vermelha quando comparada à atividade dos padrões BHT, ácido gálico e ácido ascórbico.

Ao avaliar o teor de fenólicos e o poder redutor de *Palmaria palmata*, *Laminaria setchellii*, *Macrocystis integrifolia* e *Nereocystis leutkeana*, Yuan e Walsh (2006) relataram que essas espécies possuem alto poder redutor com teores de fenólicos variando de 1,84 a 12,8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extrato. Os autores concluíram que há uma correlação positiva entre a atividade e o teor de fenólicos, sendo a bioatividade de responsabilidade dos florotananos e polifenóis, dentre eles os ácidos fenólicos.

Nahas et al. (2007) avaliaram a capacidade de sequestro de radicais livres de treze espécies de algas, pelos métodos do DPPH e quimioluminescência. Os extratos da alga parda *Taonia atomaria* exibiram a maior atividade. Por separação cromatográfica, seguida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, os autores isolaram seis metabólitos bioativos, taondiol, isoepitaondiol, estipodiol, estipoldiona, sargaquinona e sargaol.

A alga parda *Ecklonia cava* também teve sua atividade antioxidante avaliada por Li et al. (2009), via fracionamento e purificação bioguiados. Os autores encontraram sete florotananos com expressiva atividade, que podem ser utilizados como antioxidantes naturais na indústria farmacêutica e cosmética, e como alimentos funcionais.

## 2.7 Atividade antimicrobiana das algas marinhas

Em comparação às várias pesquisas sobre atividade antioxidante das algas marinhas, a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por esses organismos é pouco relatada na literatura.

De acordo com Oh et al. (2008), os polifenóis halogenados presentes nas algas, dentre eles os bromofenóis, são os compostos majoritariamente responsáveis pela expressiva atividade antimicrobiana que as algas têm demonstrado. Além dos metabólitos secundários, as algas também possuem, em sua composição química, ácidos, alcalóides e aminas, substâncias que lhes conferem forte atividade antimicrobiana (HELLIO et al., 2000; LAM; HARDER, 2007).

A atividade antimicrobiana de extratos de *Bifurcaria bifurcata* foi avaliada de acordo com a variação sazonal, contra *Cobetia marina* e *Pseudoalteromonas*

*haloplanktis*. Os autores concluíram que a máxima atividade antimicrobiana pode ser obtida em algas coletadas entre abril e julho, quando a temperatura da água e a luminosidade apresentam-se mais altas na França (MARÉCHAL et al., 2004).

A atividade antimicrobiana de extratos da alga *Cystoseira barbata* foi investigada contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *Candida albicans*. O extrato hexânico demonstrou maior atividade que os extratos metanólico, diclorometânico e clorofórmico. Além disso, os autores constataram que os óleos dessa alga não apresentaram atividade antimicrobiana (OZDEMIR et al., 2006).

Kuda et al. (2007) avaliaram a atividade antibacteriana de duas espécies do gênero *Ecklonia* (*E. stolonifera* e *E. kurome*) contra cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus*. Observou-se que as algas apresentaram atividade contra todas as bactérias, com exceção de *E. coli*. É conhecido que *Ecklonia sp* possui atividade bactericida. Nagayama et al. (2002) descreveram que os florotaninos de *E. kurome* apresentavam forte atividade bactericida.

Uma série de bromofenóis foram sintetizados e isolados da alga vermelha *Odonthalia corymbifera* e sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos. Entre os isolados, o 2,2,3,3-tetrabromo-6,6-diidroxidifenilmetano demonstrou ser mais ativo contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, e *Trichophyton mentagrophytes*. O bromofenol sintético 3,3-dibromo-6,6-diidroxidifenilmetano e o 3,3,5,5-tetrabromo-6,6-diidroxidifenilmetano mostraram potente efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella typhimurium* (OH et al., 2008).

Dubber e Harder (2008) investigaram os efeitos antimicrobianos dos extratos hexânico e metanólico das algas *Mastocarpus stellatus*, *Laminaria digitata* e *Ceramium rubrum* em 19 bactérias patogênicas ao pescado. O extrato metanólico de *C. rubrum* a 10 mg/mL e o extrato hexânico de *L. digitata* a 31 mg/mL demonstraram forte atividade antimicrobiana e inibiram todas as bactérias testadas.

## **2.8 Produção e comercialização das algas marinhas**

A importância das algas marinhas, na América Latina, como recurso renovável, vem crescendo continuamente, porque seus volumes cada vez maiores

de extração geram importantes divisas econômicas para o país produtor (OLIVEIRA, 1997).

No Brasil, a região costeira compreendida entre o Estado do Ceará e o norte do Estado do Rio de Janeiro abriga a flora algal mais diversificada do país. No tocante à exploração de espécies com fins comerciais, a atividade de maior porte corresponde à coleta de algas vermelhas (*Gracilaria* e *Hypnea*) no litoral do Nordeste, principalmente na costa entre os Estados do Ceará e da Paraíba. A coleta da *Gracilaria* vem sendo feita desde a década de 1960, por colheita manual ou através de mergulho livre, para fins de exportação ou para processamento no próprio país, na produção do ágar. A *Hypnea* tem sido exportada como matéria-prima ou processada para a indústria de carragena; neste caso, a biomassa é coletada em algas arribadas nas praias, e não diretamente nos locais de crescimento. Entre o Estado do Espírito Santo e a região de Búzios, RJ, uma característica marcante é a presença de vasta área coberta por fundos de algas calcárias, com teor de carbonatos superior a 90%, estendendo-se por várias dezenas de metros de profundidade e aflorando nas marés baixas. Este banco de algas calcárias tem despertado interesse e vem sendo explorado para a produção de adubos e aditivos para rações (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Outros países da América do Sul estão mais adiantados que o Brasil na produção e extração de algas, embora o país seja reconhecido como avançado em nível acadêmico (SANTOS; GOMES, 2006).

Entre as algas comestíveis existentes em águas brasileiras, destacam-se as do gênero *Porphyra*, o mesmo da Nori japonesa. Porém, a *Porphyra* brasileira ainda não tem mercado de consumo interno e não compete com as japonesas e chinesas. Estes países estão escolhendo as melhores linhagens para cultivo há séculos e garantindo melhor qualidade, além da quantidade produzida ser mais elevada (SANTOS; GOMES, 2006).

A produção total global de algas, no ano de 2008, foi de, aproximadamente, 600 mil t, via captura e 13,2 milhões de t, via aquacultura. A maior parte é constituída pelas algas pardas, 462.097 t, pela captura e 6.626.440 t, pela aquacultura, seguida pelas algas vermelhas, 168.038 t, via captura e 6.588.144 t, via aquacultura (FAO, 2010).

## 2.9 Efeito sinérgico de produtos naturais

O efeito sinérgico de extratos de produtos naturais tem sido estudado por diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo. Além da atividade antimicrobiana, outras atividades biológicas foram avaliadas, utilizando a combinação entre extratos e também entre extratos e substâncias puras, biologicamente ativas.

Combinações de extratos, em geral, podem ajudar a minimizar a utilização de óleos essenciais como agentes antimicrobianos e diminuir o impacto sensorial destes nos alimentos. As combinações de extratos podem controlar bactérias que apresentem alta resistência aos antimicrobianos de plantas, como a *Pseudomonas spp* (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; HOLLEY; PATEL, 2005)

Pesquisas recentes têm demonstrado a existência do efeito sinérgico entre alguns componentes primários e secundários das plantas, sendo observado que os componentes secundários atuam como potencializadores dos componentes primários (KAMEL, 2000).

Em um estudo com o objetivo de avaliar o conteúdo total de fenólicos, antocianinas e a capacidade antioxidante do extrato de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) de duas variedades, Tannat e Ancelot, utilizando diferentes sistemas solventes, ROCKENBACH et. al. (2008) observaram que a mistura de BHT e extratos de bagaço de uva produziu efeito sinérgico, mantendo os percentuais de inibição semelhantes aos obtidos com o antioxidante sintético Trolox, aplicado isoladamente.

Ao analisar a atividade antimicrobiana de extratos de diferentes partes de *Calceolaria chelidonioides*, Falcão et. al. (2006) sugeriram que as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana se encontram diluídas nos extratos etanólicos e apresentam um efeito sinérgico quando misturados.

Cahyana, Shuto e Kinoshita (1993) analisaram os possíveis efeitos sinérgicos de derivados porfirínicos, clorofila a, feofitina a e pirofeofitina a com o  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico. Todas as substâncias testadas apresentaram melhor efeito antioxidante na presença de  $\alpha$ -tocoferol ou ácido ascórbico, sugerindo um efeito sinérgico.

Em estudos realizados por Le Tutour et al. (1990), foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos apolares de 7 algas marinhas bentônicas da costa francesa. Os resultados obtidos para as algas pardas, *Laminaria digitata* e

*Himanthalia elongata*, mostraram sinergia com a vitamina E, no teste de estabilidade do éster metílico de óleo de girassol. No ano de 1998, Le Tutour (1998) ampliou a pesquisa para 3 algas pardas, *Fucus vesiculosus*, *F. serratus* e *Ascophyllum Nodosum* com o intuito de isolar e identificar os princípios responsáveis pela atividade antioxidante e verificar a sinergia destes com a vitamina E. Todos os extratos analisados mostraram a propriedade de estender o período de indução da oxidação do substrato e o efeito sinérgico com a vitamina E.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica de extratos de algas como agentes antimicrobianos e antioxidantes, como alternativa aos aditivos químicos, a serem aplicados na elaboração de *Minced* de tilápia

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os extratos de quatro espécies de algas marinhas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de algas *in vitro*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de algas *in vitro*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de algas por métodos acelerados;
- Avaliar os extratos de algas como agentes antioxidantes, em diferentes concentrações, no *Minced* de tilápia acondicionado em embalagem de polietileno, recém processado e aos 60, 120 e 180 dias, sob armazenamento a -18°C.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Algas**

As amostras da alga vermelha Nori (*Porphyra tenera*) e das algas pardas Kombu (*Laminaria japonica*), Wakame (*Undaria pinnatifida*) e Hijiki (*Hijikia fusiformis*) foram obtidas na forma desidratada, em empresas fornecedoras de produtos alimentícios orientais.

#### **4.1.2 Tilápias**

Foram utilizadas 135 unidades de tilápia nilótica (*Oreochormis niloticus*), perfazendo um total de 74,3 Kg. Os peixes foram provenientes da Piscicultura Palmares, localizada na região de Igaratá, Estado de São Paulo e coletadas em janeiro de 2011.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Preparo dos extratos de algas**

Os extratos de algas foram preparados variando-se o solvente extrator e o tempo de extração. As algas desidratadas foram trituradas em moinho e, em seguida, 3 g de cada alga, foram homogeneizadas em 30 mL de soluções de etanol a 60%, 80% e 100% (v/v). O tempo de extração, conforme proposto por Lullier; Horta; Falkenberg (2006) é de 7 dias em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Porém, nesta pesquisa, além dos 7 dias foram testados 2 dias de extração, com o objetivo de diminuir o tempo gasto na extração dos compostos bioativos. Com isso, houve no total 24 extratos distintos ( $n = 4 \text{ algas} \times 3 \text{ solventes} \times 2 \text{ tempos de extração}$ ). Os extratos foram filtrados em papel, armazenados em frasco âmbar devidamente etiquetados, e em seguida, armazenados a 8°C, até o momento das análises.

## **4.2.2 Análise da composição química dos extratos das algas**

### **4.2.2.1 Compostos fenólicos totais**

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, uma alíquota de cada um dos extratos (0,5 mL) a 10 mg/mL foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% (m/v) em água destilada. Após 2 h de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

### **4.2.2.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível dos extratos de algas**

A determinação do espectro de absorção dos extratos de algas na concentração de 30 mg/mL foi realizada segundo o método descrito por Oldoni (2007), com modificações. Os espectros de absorção na região UV visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm em espectrofotômetro UV-Mini 1240, Shimadzu-Co.

### **4.2.2.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência**

As análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência foram feitas injetando-se dois microlitros de cada extrato em um cromatógrafo líquido, marca Waters, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 240 nm e uma coluna Waters Acquity UPLC BHE C18 (2,1 x 100 mm), com tamanho da partícula 1,7µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (99,5:0,5 v/v) (solvente A) e água/ácido acético/n-butanol (92,5:0,5:7 v/v) (solvente B). O fluxo foi de 0,45mL/min. O gradiente utilizado foi o seguinte: 10% solvente A (24 s); 5% de A (até 2 min e 24 s); 5% de A (3 min e 24 s); 1% de A (até 3 min e 30 s); 1% de A (4 min e 30 s); 5% de A (até 4 min e 48 s); 5% de A (4 min e 54 s); 10% de A (até 8 min). A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 40 °C e os cromatogramas foram

processados utilizando o *software Empower PRO*. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Foram utilizados os padrões autênticos de ácido clorogênico, ácido ferrúlico, ácido caféico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido hidroxicinâmico.

#### **4.2.2.4 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM)**

##### **4.2.2.4.1 Derivatização-formação dos derivados do trimetilsilil (TMS)**

Aos extratos das algas Nori e Hijiki (aproximadamente 18 mg), previamente liofilizados, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente derivatizante MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida). Para a ocorrência da reação de derivatização, a mistura foi levada em estufa a 70 °C, durante 10 min. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da reação, rediluído em hexano.

##### **4.2.2.4.2 Condições analíticas do sistema CG-EM**

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso, Shimadzu GC 2010, acoplado ao espectrômetro de massas, Shimadzu QP 2010 *Plus*, e foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). A programação de temperatura iniciou-se em 80 °C (1 min), à taxa de 5 °C/min, alcançou 200 °C (1 min) passou a 250 °C (8 min) à taxa de 5 °C/min, a 300 °C (5 min) à taxa de 10 °C/min e a 310 °C (10 min), à taxa de 10 °C/min, totalizando 65 min de análise. O hélio foi utilizado como gás de arraste em fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de 280 °C e o volume de injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  em modo *split* (1:30). A interface foi mantida a 280 °C e o detector operou no modo *scanning* ( $m/z$  40-800). Os compostos foram identificados por comparação da biblioteca Wiley 8 e os não identificados foram caracterizados pelos íons moleculares principais, de acordo com a relação massa-carga ( $m/z$ ).

### **4.2.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos etanólicos das algas**

#### **4.2.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com o descrito em CLSI (2005). Foram utilizados como microrganismos teste: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).

As bactérias foram inicialmente reativadas, a partir das culturas estoque, mantidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), por 18 a 24 h, a 37 °C e, posteriormente, cultivados em BHI ágar. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com o auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. O volume de 100 µL das suspensões bacterianas (previamente padronizadas em 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL por turbidimetria, a 625 nm) foi inoculado em 100 mL de caldo BHI, atingindo contagem final de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 190 µL do meio de cultura inoculado. Em seguida, foram adicionados 10 µL dos extratos das algas, em concentrações variando de 5000 a 19,53 µg/mL (em diluição seriada de razão 2). Como controle positivo, foi utilizada a Clorexidina (0,12% v/v) e como controle negativo, etanol 60, 80 e 100% (v/v), solventes utilizados na extração. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C e, após a incubação, foram adicionados 30 µL do corante Resazurina (0,01% m/v) para revelar os poços com crescimento bacteriano. Nos poços em que não houve mudança na cor do corante foi considerada ausência de bactérias viáveis. A análise foi realizada em triplicata.

#### **4.2.3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da CBM foi realizada com base nos resultados obtidos no teste da CIM, utilizando-se as suspensões provenientes dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano. Uma alíquota de 10 µL dessas suspensões foi inoculada em placas BHI ágar esterilizado. Após a incubação por 24 h a 37 °C, a CBM considerada foi a que correspondeu à menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível no ágar.

#### 4.2.3.3 Sinergismo – Método do tabuleiro

Foram utilizados como microrganismos teste: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), pois *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) tiveram seu crescimento inibido pelos extratos de algas marinhas.

As bactérias foram inicialmente reativadas a partir das culturas estoque em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 18-24 h a 37 °C e, posteriormente, cultivados em BHI ágar. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com o auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas (previamente padronizadas em 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL por turbidimetria, a 625 nm) foi inoculado em 100 mL de caldo BHI, atingindo contagem final de 10<sup>5</sup> UFC/mL.

O método do tabuleiro foi realizado de acordo com Moody (2003) e Schelz, Molnar e Hohmann (2006). Esse método permite a obtenção dos índices de Concentração Inibitória Fracional (FIC), utilizados na interpretação dos resultados do efeito sinérgico. A microplaca foi montada da seguinte maneira: dois extratos foram testados de cada vez, sendo que um extrato foi diluído (razão 2) ao longo do eixo x, enquanto o outro foi diluído ao longo do eixo y. O volume final de cada poço foi de 200 µL, compreendidos por 10 µL de cada diluição do extrato e 180 µL de caldo BHI inoculado (10<sup>5</sup> UFC/ml). As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C e, após a incubação, foram adicionados 30 µL do corante Resazurina (0,01% m/v) para verificar em quais poços houve crescimento bacteriano. Nos poços em que não houve mudança na cor do corante foi considerada ausência de bactérias viáveis. A análise foi realizada em triplicata. Os extratos de algas escolhidos para realizar essa análise foram os extraídos por 2 dias com etanol 100% (v/v), já que estes apresentaram maior atividade antimicrobiana independentemente da alga.

Os extratos das algas Nori, Hijiki, Kombu e Wakame foram combinados, dois a dois, de forma que todos os extratos fossem testados entre si. As combinações foram: Nori x Hijiki; Nori x Kombu; Nori x Wakame; Hijiki x Kombu; Hijiki x Wakame; Kombu x Wakame.

Foram utilizadas concentrações variando de 5000 µg/ml até 625 µg/ml, (diluição seriada de razão 2) Como controles foram utilizados os seguintes testes: meio inoculado + etanol 100%, meio inoculado sem adição de agente antimicrobiano e meio inoculado + clorexidina.

Os índices FIC são calculados como  $FIC_A + FIC_B$ , onde  $FIC_A$  e  $FIC_B$  são as concentrações mínimas que inibem o crescimento bacteriano para os extratos “A” e “B”, respectivamente. Logo:  $FIC_A = CIM_A$  em combinação/ $CIM_A$  sozinho; e  $FIC_B = CIM_B$  em combinação/ $CIM_B$  sozinho. Os resultados são interpretados como sinergismo ( $FIC < 0,5$ ), adição ( $0,5 \leq FIC \leq 1$ ), indiferença ( $1 < FIC \leq 4$ ), ou antagonismo ( $FIC > 4$ ).

#### 4.2.4 Atividade Antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos das algas

##### 4.2.4.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH

A medida da atividade sequestradora do radical DPPH dos extratos foi realizada de acordo com Brand-Willians, Couverlier e Berset (1995). A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3,0 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH: 0,5 mM em etanol. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 517 nm após 45 min de reação. As amostras foram avaliadas nas concentrações finais de 50 e 100 µg de compostos fenólicos/mL e a substância padrão ( $\alpha$ -tocoferol) na concentração final de 100 µg/mL. A atividade antioxidante foi calculada por meio da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH que continha as amostras e padrão, após 45 min de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol), de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Atividade Antioxidante} = \frac{100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100]}{A_{\text{controle}}}$$

onde:

$A_{\text{amostra}}$  = absorbância da solução DPPH + amostras

$A_{\text{branco}}$  = absorbância da solução sem adição de DPPH

$A_{\text{controle}}$  = absorbância da solução referência de DPPH.

#### 4.2.4.2 Inibição da oxidação acoplada do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

A inibição da oxidação acoplada do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi avaliada de acordo com Emmons, Peterson e Paul (1999). Foram pesados 10 mg de  $\beta$ -caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, retirou-se uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio/ $\beta$ -caroteno e que foi adicionada a 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido sob corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água previamente aerada durante 30 min. Alíquotas de 3,0 mL da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 50  $\mu$ L dos extratos de algas, nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ g/mL e da substância padrão ( $\alpha$ -tocoferol) na concentração de 100  $\mu$ g/mL. A oxidação da emulsão foi monitorada espectrometricamente (Uv Mini 1240) a 470 nm, no tempo inicial e após 120 min de incubação, a 50 °C e, a atividade antioxidante, obtida a partir da taxa de degradação do controle (emulsão sem o acréscimo de antioxidante) com a taxa de degradação da emulsão na presença do padrão ou amostras, de acordo com a fórmula:

$$AA (\%) = [(DRc - DRs)/DRc] \times 100$$

Onde:

DRc = taxa de degradação do controle:  $[\ln(a/b)/120]$

DRs = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato:  $[\ln(a/b)/120]$

“a” e “b” são as absorbâncias no tempo inicial e no tempo final (120 min), respectivamente.

#### 4.2.5 Atividade antioxidante dos extratos de algas por meio de métodos acelerados

##### 4.2.5.1 Estabilidade oxidativa em óleo – Rancimat

Amostras de 5 g de óleo de soja fornecido pela empresa Cargill, Lote: 19229, validade: 16/05/2011, sem adição de antioxidantes foram misturadas com os extratos etanólicos a 60%, submetidos a 2 dias de extração, das algas marinhas Nori

e Hijiki, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, com base no teor de compostos fenólicos. Em seguida, a mistura foi submetida à temperatura de  $110 \pm 1$  °C sob fluxo de ar seco a taxa de 9 L/h, conforme o método cd12b-92 (AOCS, 2003), em equipamento Rancimat 743, Metrohm AG, CH-9100, Herisau, Switzerland. As leituras de condutividade crescente, em função do acúmulo de compostos de oxidação, compuseram a curva que, traçada em função do tempo de reação, permitiu o cálculo do período de indução (PI). Um controle preparado com óleo de soja, sem antioxidante, e amostras contendo antioxidante sintético BHT, na concentração de 100 µg/mL, também foram submetidas a essa análise. O Fator de Proteção (FP) foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{FP} = \frac{\text{PIa}}{\text{PIc}}$$

Onde: PIa = Período de indução do óleo de soja com adição das amostras ou padrão.

PIc = Período de indução do controle (óleo de soja sem adição das amostras ou padrão).

#### **4.2.5.2 Estabilidade oxidativa de *Minced* de tilápia - Oxipres**

##### **4.2.5.2.1 Processamento do *Minced***

Para o teste em Oxipres, foram utilizados 12 exemplares de tilápias (*Oreochromis niloticus*), perfazendo cerca de 6 Kg, adquiridas em uma rede de supermercado, em Piracicaba, SP. Na Planta de Processamento do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ-USP, as tilápias foram descamadas, evisceradas e descabeçadas. A matéria-prima resultante, pesando cerca de 3 Kg, foi processada conforme Angelini (2010), para a obtenção de CMS. Após o processamento inicial, a CMS foi submetida ao procedimento de lavagem com água gelada (10 °C), na proporção de 3 L de água para 1 Kg de CMS, agitação durante 2 min e repouso por 3 min. Em seguida, o material foi drenado para a retirada do excesso de água.

#### 4.2.5.2.2 Estabilidade oxidativa

Amostras de 50 g de *Mincned* foram homogeneizadas com os extratos das algas marinhas Nori e Hijiki, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, com base no teor de compostos fenólicos. Um controle sem antioxidante e o *Mincned* contendo o antioxidante sintético BHT, na concentração de 100 µg/mL, também foram submetidas a essa análise. Em seguida as amostras foram inseridas no equipamento Oxipres, Mikrolab Asrhus, à temperatura de 100 °C e pressão de oxigênio de 0,5 MPa (DANISCO, 2007). As leituras do decaimento da pressão de oxigênio, causada pela reação deste elemento com radicais livres produzidos pela oxidação da amostra, compuseram a curva que, traçada em função do tempo, permitiu o cálculo do período de indução.

O Fator de Proteção (FP) e a extensão da vida útil em relação à amostra sem antioxidante (EV) foram calculados usando as seguintes equações:

$$FP = P_{Ia}/P_{Ic} \quad EV = (FP - 1) \times 100$$

Onde:

$P_{Ia}$  = Período de indução da amostra com antioxidante (natural ou sintético)

$P_{Ic}$  = Período de indução do controle (amostra sem antioxidante)

Para esta avaliação, o *Mincned* foi dividido em oito tratamentos, sendo T1- sem antioxidante; T2- BHT a 100 µg/mL; T3- Nori 25 µg/mL; T4- Nori 50 µg/mL; T5- Nori 100 µg/mL; T6- Hijiki 25 µg/mL; T7- Hijiki 50 µg/mL; T8- Hijiki 100 µg/mL.

#### 4.2.6 Atividade antioxidante dos extratos de algas aplicados em *Mincned* de tilápia – Estudo da vida útil

##### 4.2.6.1 Processamento da CMS e do *Mincned* de tilápia

Na Planta de Processamento, os peixes (item 4.1.2) foram pesados inteiros (Figura 1), lavados com água potável, descamados, eviscerados e descabeçados (Figura 2). Após nova lavagem, os peixes foram processados em despolpador mecânico, marca HIGH TECH, modelo HT 100-C, para a obtenção da CMS – carne

mecanicamente separada (Figura 3) (ANGELINI, 2010). A CMS obtida foi lavada com água potável, com mínimo de 0,5 mg/L de cloro residual livre (BRASIL, 2011), a 10 °C. Para a lavagem, foram utilizados 3 L de água para 1Kg de CMS (Figura 4). Foi feita homogeneização, manualmente, por 3 min e, a seguir, o material permaneceu em repouso por 3 min. A CMS lavada foi acondicionada em saco de *nylon* e centrifugada para a drenagem do excesso de água (Figura 5). Ao *Minced* (Figura 6), foram adicionados os extratos das algas Nori e Hijiki, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL (com base no teor de compostos fenólicos totais). Uma amostra controle foi preparada nas mesmas condições, sem a adição dos extratos de algas e, como controle positivo, foi adicionado ao *Minced*, o BHT a 100 µg/mL, totalizando 6 tratamentos. As amostras foram embaladas em porções de 300g em sacos de polietileno, congeladas e estocadas a -18 °C. As análises de composição centesimal, ácidos graxos, microbiológicas, de frescor e sensorial foram realizadas no dia do processamento (início) e aos 60, 120 e 180 dias de armazenamento.



Figura 1- Tilápias *in natura*



Figura 2- Pré-processamento



Figura 3- Obtenção da CMS



Figura 4- Lavagem



Figura 5- Drenagem

Figura 6- *Minced* de tilápia

#### 4.2.6.2 Composição química do *Minced* de tilápia

##### 4.2.6.2.1 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado pela perda de peso da amostra em estufa aquecida a  $105 \pm 1^\circ\text{C}$ , até peso constante (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985). Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g/100.

##### 4.2.6.2.2 Proteína Bruta

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

##### 4.2.6.2.3 Lipídeos Totais

O teor de lipídeos foi determinado por meio do método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente extrator (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985). Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g/100.

#### 4.2.6.2.4 Perfil e teor de ácidos graxos

Após a extração dos lipídeos, seguiu-se com o preparo dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Foram pesados cerca de 100 mg da amostra em tubo de centrífuga de 20 mL com tampa. Foram adicionados 2 mL de n-hexano e em seguida 0,2 mL de solução metanólica de KOH 2 M. O tubo foi fechado e agitado em vortex por 30 seg. Foram adicionados 3 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A mistura foi deixada em repouso até a separação das fases. A fase superior foi utilizada para a análise por cromatografia em fase gasosa. Foi utilizado cromatógrafo gasoso, marca Young Li, modelo 6000 series, com detector de ionização de chama, com as seguintes condições operacionais: coluna Supelco 2560 com dimensões de 10m x 0,25mm x 0,2 µm; programação da temperatura da coluna para 45 °C por 4 min, primeira rampa de 13 °C/min até 175 °C (27 min), segunda rampa de 4 °C/min até 215 °C (35 min), temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 220 °C e razão de divisão da amostra 1:50. Foi injetado 1 µL da amostra no cromatógrafo, utilizando microsseringa de 10 µL. Os picos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos com os componentes separados da amostra, utilizando-se o *software* YL-Clarity (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.2.6.2.5 Cinza

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

#### 4.2.6.3 Cor instrumental

Para a determinação da medida física da cor foi utilizado um colorímetro portátil da marca Minolta Chroma Meter, modelo CR-400, no qual se realizou a leitura dos parâmetros L\* (luminosidade), a\* (intensidade de vermelho/verde) e b\* (intensidade de amarelo/azul) do sistema CIELab, com fonte illuminate D65, calibrado em porcelana branca padrão com Y=93,7; x=0,3160 e y= 0,3323. As

leituras foram realizadas na superfície das amostras inteiras, sobre uma superfície opaca.

#### **4.2.6.4 Avaliação do frescor**

##### **4.2.6.4.1 pH**

A mensuração do pH foi realizada por meio de potenciômetro digital Digimed, sendo utilizados 10 g de amostra e 100mL de água destilada, conforme Pregnoatto e Pregnoatto (1985).

##### **4.2.6.4.2 Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT)**

Para a realização dessa análise foi efetuada uma adaptação, segundo Savayda-Silva et al. (2008), a partir do método de destilação, descrito em “Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes: sal e salmoura”, da normativa nº 20 de 21 de julho de 1999 (BRASIL, 1999). Foram homogeneizados 50 g de amostra com 150 mL de ácido tricloroacético para a precipitação do nitrogênio protéico. O filtrado, contendo o nitrogênio volátil, foi alcalinizado a vapor, recebido em solução de ácido bórico e titulado com solução de ácido sulfúrico 0,01N, padronizado em presença de indicador misto. O cálculo do teor de BNVT foi obtido pela fórmula:

$$\text{BNVT mg/100g} = \frac{(14 \times 190 \times V \times F \times N \times 100)}{(P \times V')}$$

onde:

V: volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> titulado

F: fator de correção do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

N: normalidade do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P: peso da amostra

V': volume da alíquota do filtrado

#### 4.2.6.4.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, indicador de peroxidação lipídica, foi avaliado pelo método de extração em ácido tricloroacético (TCA), conforme Vyncke (1970), utilizando o Tetrametoxipropano para a obtenção da equação de reta utilizada no cálculo dos valores de TBARS ( $y = 104,7x + 0,011$ ).

Para a extração dos aldeídos foi preparado um extrato ácido aquoso homogeneizado em Ultra-Turrax, com 5 g de amostra e 25 mL de ácido tricloroacético (TCA) diluído em propil galato (PG) e um agente quelante, o EDTA sódico, com a finalidade de evitar a formação errônea de malonaldeído ou outras substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) durante mistura e filtração da amostra. Esse extrato filtrado reagiu com a solução de TBA sob aquecimento (95 °C) por 40 min, em banho-maria, para a formação do complexo colorido, o qual foi medido em espectrofotômetro Fenton 600 Plus, no comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em “valor de TBARS”, definido como mg de malonaldeído por Kg de amostra.

#### 4.2.6.5 Avaliação microbiológica

Foram realizadas as análises microbiológicas previstas pela ANVISA para produtos derivados de pescado (*surimi* e similares) e produtos à base de pescado refrigerados ou congelados, através da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que preconiza: contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, presença de *Salmonella* spp e Coliformes a 45 °C (BRASIL, 2001). Além destas análises, foram determinadas por plaqueamento a Contagem Total de Aeróbios Mesófilos e Psicrotróficos.

##### 4.2.6.5.1 *Staphylococcus aureus* coagulase positiva

Foram pesados 25 g de amostra e homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram feitas três diluições decimais em tubos, a partir de 1 mL e diluindo-se em 9 mL de água peptonada estéril. As placas contendo Ágar Baird-Parker (BPA) foram preparadas

48 h antecedentes ao teste. Foram inoculadas, por espalhamento em superfície, alíquotas de 0,1; 0,3; 0,3 e 0,3 mL, totalizando 1 mL da diluição  $10^{-1}$  e alíquotas de 0,1 mL, em duplicata, das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . O espalhamento do inóculo foi realizado com alça de Drigalski. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C, por 48 h. As colônias típicas foram isoladas e destinadas aos testes de gram, catalase e coagulase. O resultado foi expresso em UFC/g (SILVA et al., 2010).

#### **4.2.6.5.2 *Salmonella* spp**

Foram pesados 25 g de amostra e homogeneizados em 225 mL de Caldo Lactosado e incubados a 37 °C, por 24 h. A seguir, 1 mL do caldo foi transferido para tubo de ensaio com tampa de rosca contendo 9 mL de Caldo Tetrionato/ Iodo-iodeto e colocado em banho-maria a 45°C, por 6 a 8h. A seguir, 1,5 mL da cultura foram transferidos para o kit 1-2 *Test Salmonella* da Biocontrol System INC, cod. 10107, o qual foi incubado a 35 °C, por 24 h. O resultado foi expresso como ausência ou presença em 25 g (SILVA et al., 2010).

#### **4.2.6.5.3 Coliformes totais e termotolerantes a 45 °C**

Foram pesados 25 g de amostra e homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram feitas quatro diluições decimais em tubos, a partir de 1 mL e diluindo-se em 9 mL de água peptonada estéril. A determinação de coliformes a 45 °C foi realizada através da inoculação em série de 3 tubos da amostra em LST (Caldo Lauril Sulfato Triptose), no qual alíquotas de 1 mL das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  foram transferidas para tubos com este meio de cultura e incubados a 37 °C, por 48 h. A positividade foi indicada pela turvação do meio e formação de gás nos tubos de Durham. Para confirmação de coliformes totais, os tubos que apresentaram formação de gás e turvação do meio tiveram alíquotas passadas para tubos de Caldo VB, através de uma alça microbiológica, e foram incubados a 37 °C por 24 h. A positividade foi indicada pela turvação e formação de gás nos tubos de Durham. Para confirmação de coliformes termotolerantes, os tubos que apresentaram formação de gás e turvação do meio LST tiveram alíquotas passadas para tubos de Caldo EC, através de uma alça

microbiológica, e foram incubados a 37 °C por 24 h; A positividade foi indicada pela turvação e formação de gás nos tubos de Durhan. Os resultados foram obtidos através da tabela de Número Mais Provável – NMP e expressos em NMP/g (SILVA et al., 2010).

#### **4.2.6.5.4 Contagem Total de Aeróbios Mesófilos e Psicotróficos**

Foram pesados 25 g amostra e homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram feitas cinco diluições decimais em tubos, a partir de 1 mL e diluindo-se em 9 mL de água peptonada estéril. Alíquotas de 1 mL das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  foram inoculadas, em duplicata para cada análise, em placas de Petri e, em seguida, foi adicionado o Plate Count Agar (PCA). Após a homogeneização e completa solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 35 °C por 48 h, para a contagem de aeróbios mesófilos, e em BOD (Biological Oxygen Demand) a 20 °C por 72 h, para a contagem de psicotróficos. Os resultados foram expressos em UFC/g (SILVA et al., 2010).

#### **4.2.6.6 Análise Sensorial**

A realização desta análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética na Pesquisa, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) sob protocolo nº 94, divulgado pela circular COET/127 (ANEXO A). A análise sensorial foi realizada por meio da avaliação da intensidade da alteração na cor do *Minced* e aroma de ranço. A avaliação ocorreu por meio de uma escala hedônica estruturada, na qual os extremos representam (1) ausência e (9) intenso (Figura 7). Os testes foram realizados por uma equipe de 12 provadores treinados (funcionários e estudantes da ESALQ – USP), com faixa etária entre 18 e 40 anos.

Análise Sensorial de *Minced* de Tilápia

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Muito obrigada por participar da nossa pesquisa. Você receberá quatro amostras de *Minced* de tilápia as quais você deverá atribuir notas de 1 (ausência) a 9 (intenso) de acordo com a intensidade do critério.

Marque com um X a intensidade do **aroma de ranço** que você atribui a cada amostra.

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Marque com um X a intensidade da **alteração na cor** que você atribui a cada amostra.

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Comentários:

Figura 7- Ficha para análise sensorial, apresentada aos provadores

Dos 6 tratamentos elaborados (*Minced* com BHT; *Minced* sem antioxidante; *Minced* adicionado de Nori, em 2 concentrações; e de Hijiki, em 2 concentrações), cada provador treinado recebeu 4 amostras (4 tratamentos) de forma aleatória, em cabines individuais, sob luz branca normal, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP. As amostras do tempo zero, 60, 120 e 180 dias foram apresentadas em pratos de cerâmica e codificadas com números de 3 dígitos, selecionados aleatoriamente.

#### 4.2.7 Análise Estatística

Para os parâmetros: teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro* e atividade antioxidante por métodos acelerados, a avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do *software* SAS 9.2, pela análise de variância (ANOVA) e aplicado teste de *Tukey* para observar as diferenças significativas entre os valores médios ( $p < 0,05$ ).

Para o armazenamento congelado do *Minced* também foi utilizado o *software* SAS 9.2. Um estudo de suposições foi preliminarmente conduzido no qual se testaram os dados para homogeneidade de variância, ausência de valores discrepantes e, quando necessário, foram adotadas medidas saneadoras. Os dados foram analisados através de modelo de análise de variância apropriado para experimentos casualizados em blocos com parcelas subdivididas, com teste para comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Algas marinhas

A alga Nori, derivada da espécie *Porphyra tenera*, é utilizada na culinária japonesa para a preparação do tradicional sushi. As algas Hijiki (*Hijikia fusiformis*), Wakame (*Undaria pinnatifida*) e Kombu (*Laminaria japonica*) são utilizadas como condimentos em diversos pratos, como saladas e sopas (YUAN; BONE; CARRINGTON, 2005; YUAN; WALSH, 2006). A alga Nori apresentou cor verde brilhante enquanto que a alga Kombu apresentou-se na cor marrom (Figura 8). As algas Wakame e Hijiki apresentaram-se negras. Com relação à procedência, as algas Hijiki, Nori e Kombu foram importadas da China e a alga Wakame foi importada do Japão.

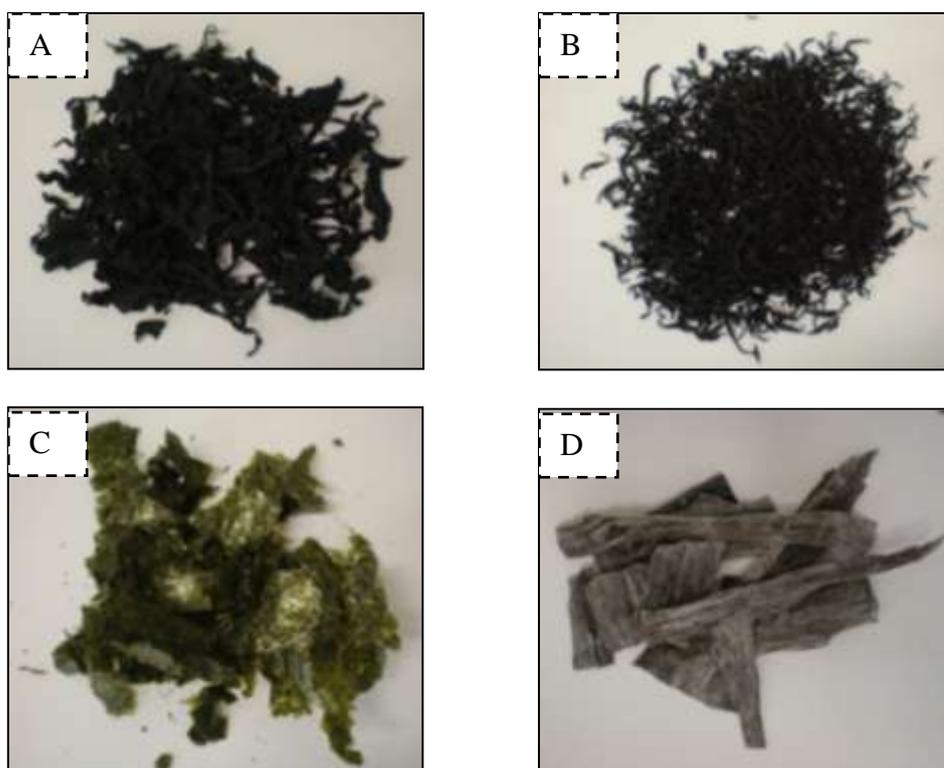


Figura 8 – Aspecto *in natura* das algas marinhas. A – Wakame (*Undaria pinnatifida*), B- Hijiki (*Hijikia fusiformis*), C – Nori (*Porphyra tenera*), D - Kombu (*Laminaria japonica*)

## 5.2 Preparação dos extratos etanólicos de algas marinhas

Na Figura 9 pode-se observar que a concentração do solvente utilizado e o tempo de extração determinaram a cor final dos extratos.

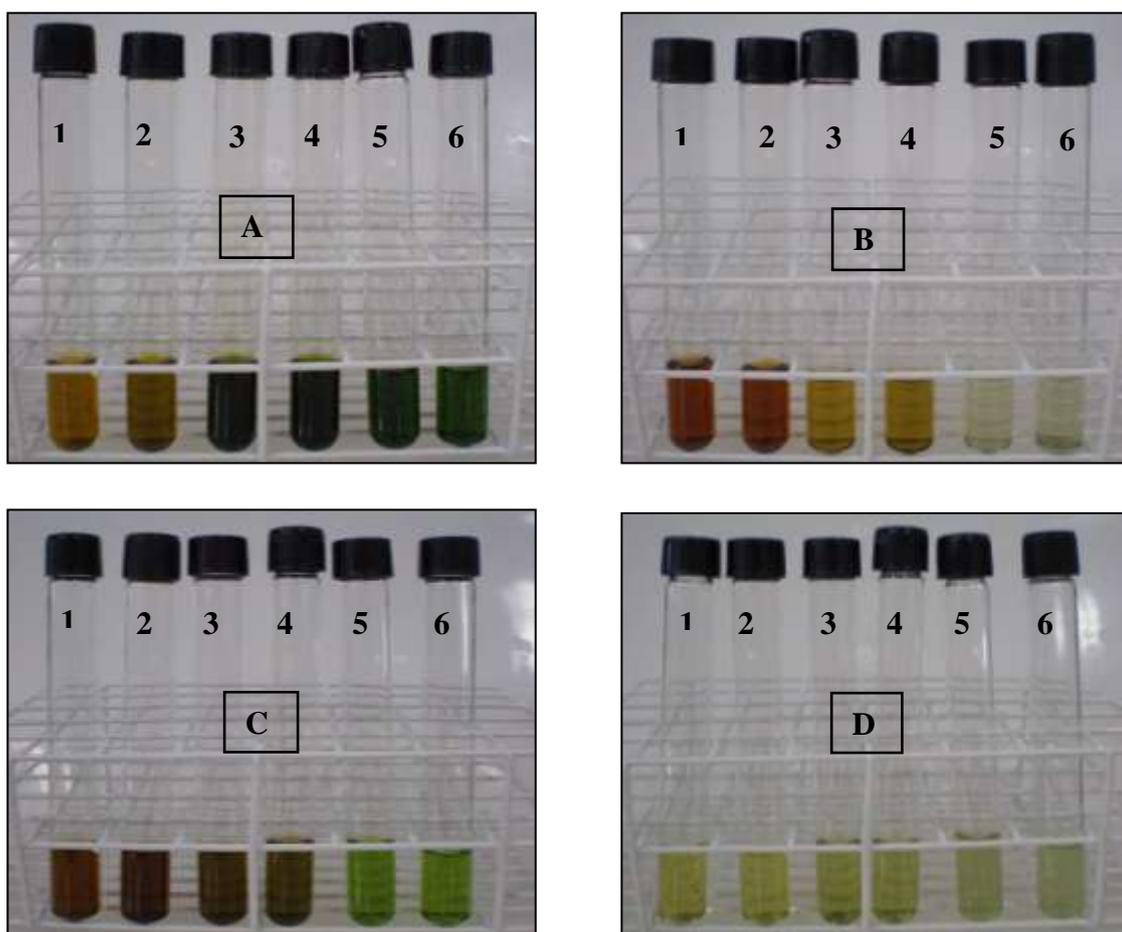


Figura 9 – Extratos etanólicos das algas marinhas. A- Wakame (*Undaria pinnatifida*), B- Hijiki (*Hijikia fusiformis*), C – Nori (*Porphyra tenera*), D - Kombu (*Laminaria japonica*). 1- etanol 60%, 7 dias de extração; 2- etanol 60%, 2 dias de extração; 3- etanol 80%, 7 dias de extração; 4- etanol 80%, 2 dias de extração; 5- etanol 100%, 7 dias de extração; 6- etanol 100%, 2 dias de extração

### **5.3 Espectros de absorção e teor de compostos fenólicos dos extratos de algas**

Os espectros de absorção na região do UV-Visível dos extratos etanólicos de algas marinhas estão ilustrados a seguir. Os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). A altura do pico pode indicar a concentração de tais compostos no extrato (CABRAL et al., 2009).

Pode-se observar que o pico de absorbância máxima para a alga Wakame (Figura 10) variou de 268 a 270 nm, sendo semelhante ao comprimento de onda absorvido pela alga Hijiki (Figura 11), entre 266 a 273 nm. Porém, seus perfis de absorção são distintos. Para a alga Nori (Figura 12), os comprimentos de onda variaram entre 330 e 338 nm, indicando que os compostos presentes nesta alga podem pertencer a uma subclasse de fenólicos diferente dos presentes nas algas Wakame e Hijiki. A alga Kombu (Figura 13) não apresentou picos de absorção significativos na região que compreende os compostos fenólicos.

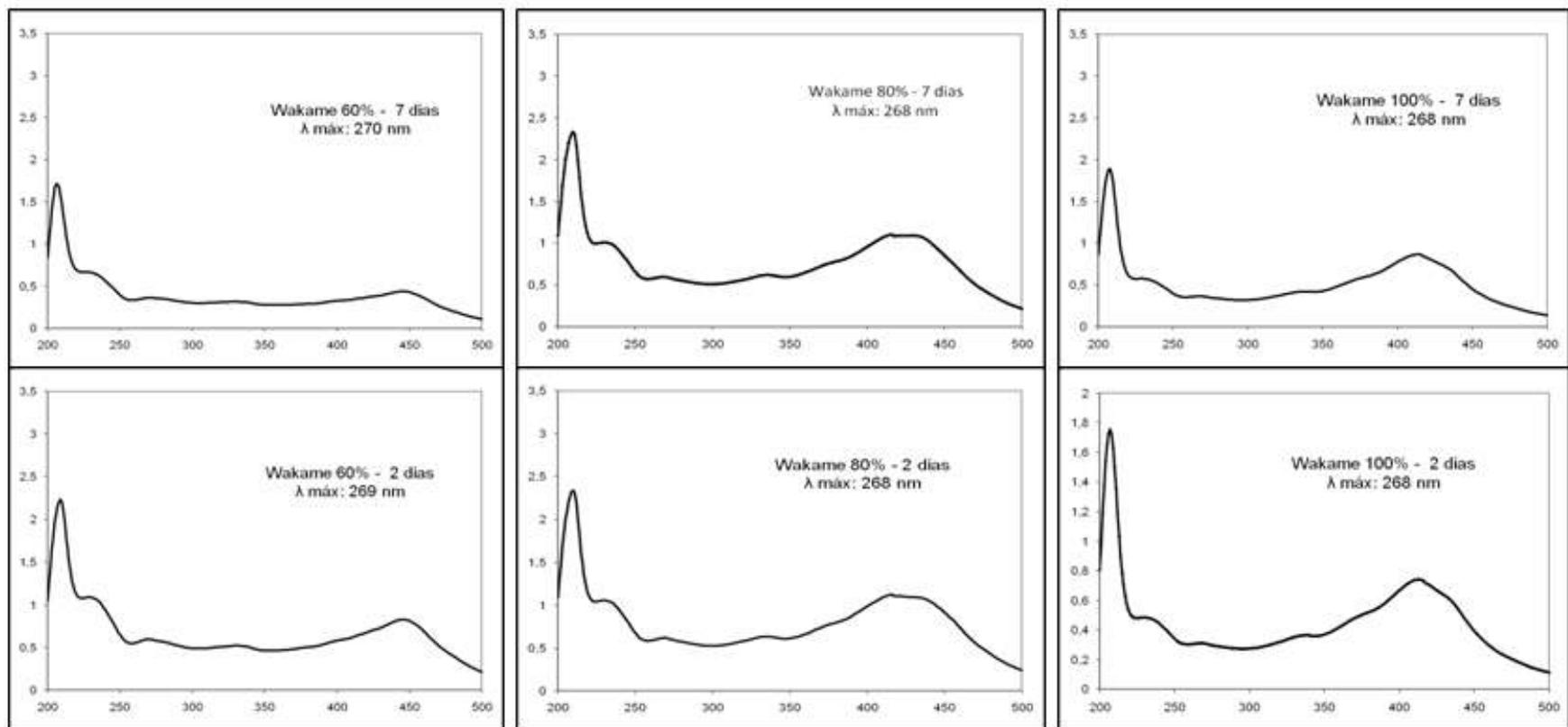


Figura 10- Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Wakame

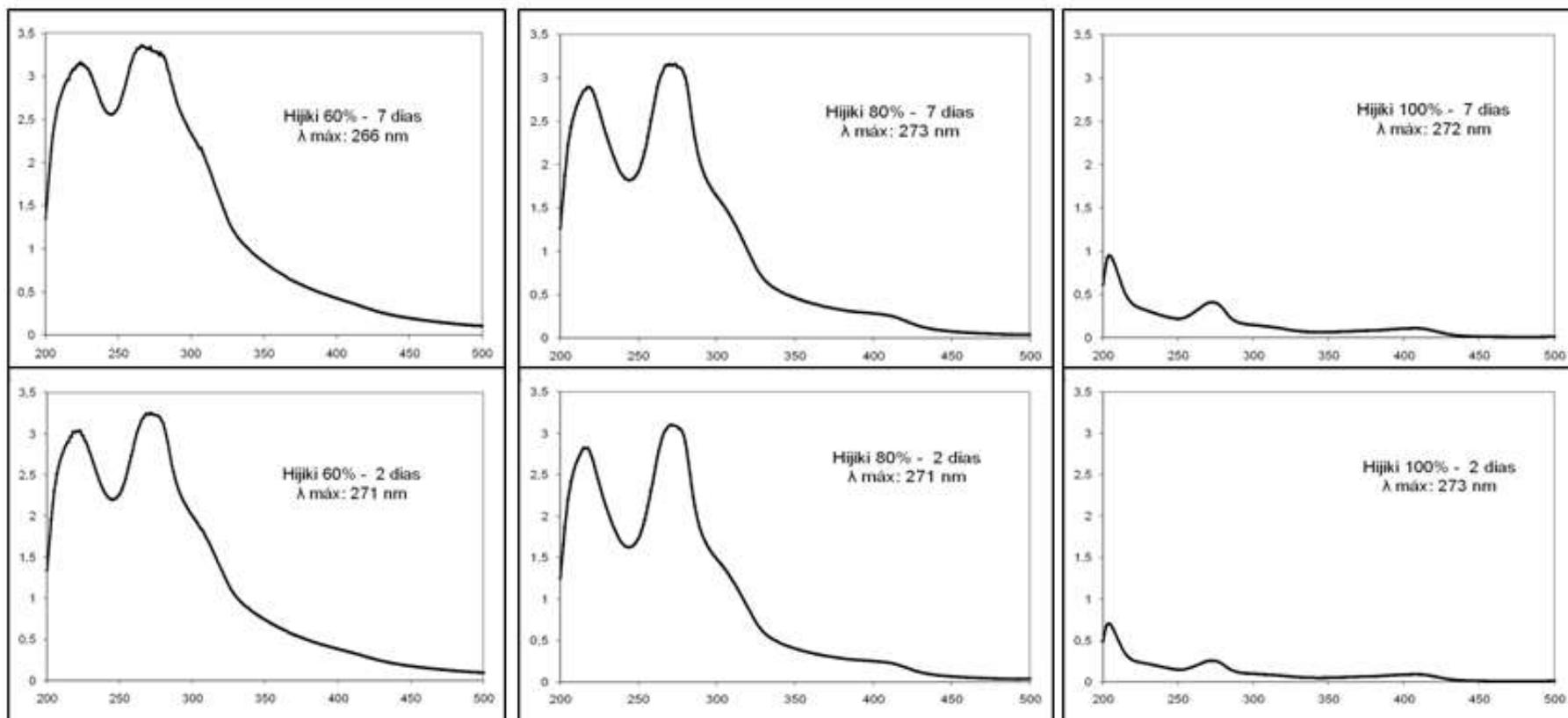


Figura 11- Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Hijiki

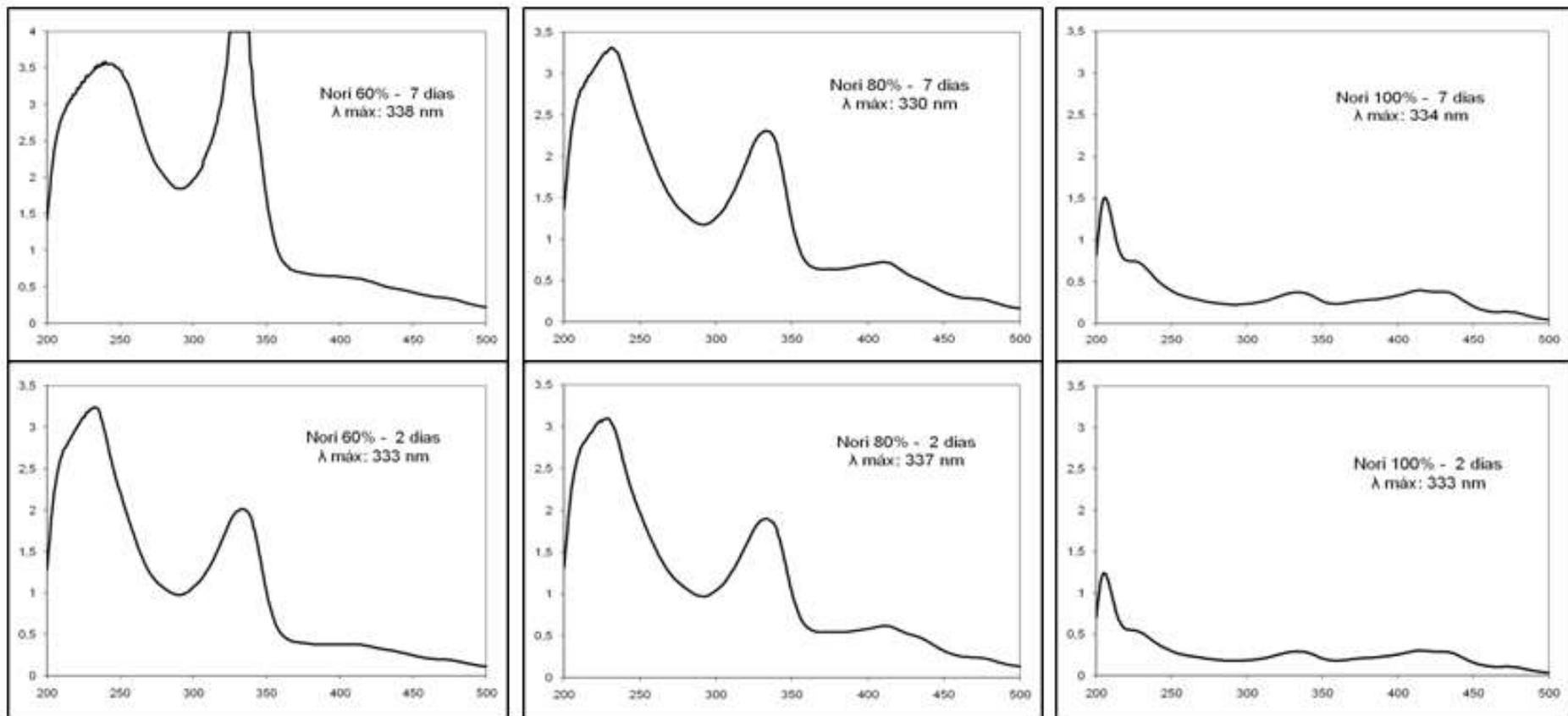


Figura 12- Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Nori

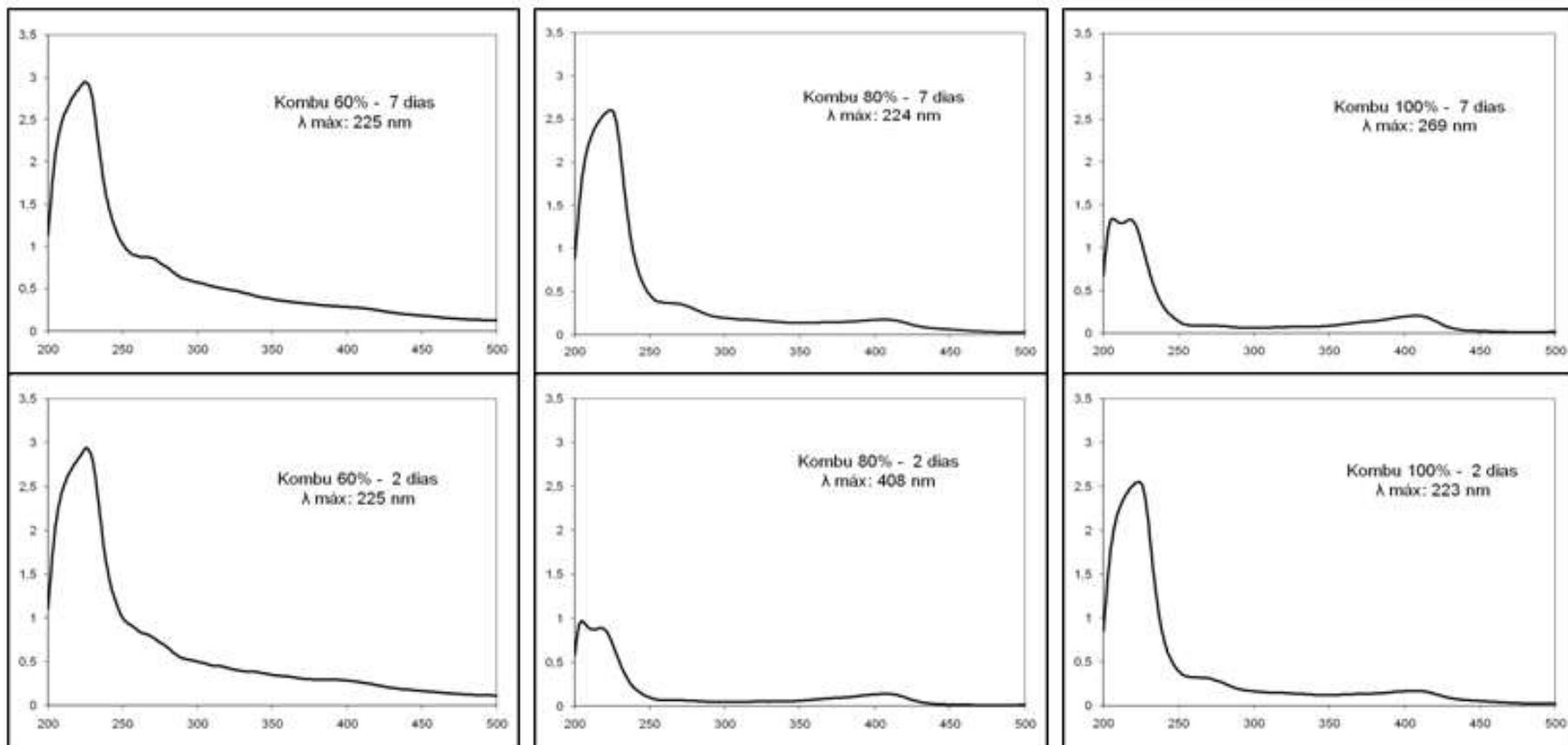


Figura 13- Espectros de absorção dos extratos da alga marinha Kombu

Sendo assim, os resultados indicam de forma preliminar que as algas Nori e Hijiki, por apresentarem os maiores picos de absorção na região descrita, podem possuir alto teor de compostos fenólicos. Para confirmar esta hipótese, o teor de compostos fenólicos de cada extrato foi analisado.

O reagente de Folin-Ciocalteu determina o teor de compostos fenólicos por meio da redução dos ânions amarelos de heteropolifosfomolibdato-tungstato, produzindo coloração azulada-acinzentada (ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006). De acordo com a Tabela 1 foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os solventes de extração, o tempo de extração e as algas. Para Nori, Kombu e Hijiki, o etanol a 60% (v/v) foi o solvente mais eficiente para extrair este tipo de compostos. Para a alga Wakame, o maior teor de fenólicos foi obtido pela extração com etanol 80% (v/v). Lullier; Horta; Falkenberg (2006) utilizaram em suas pesquisas extratos de algas que foram preparados com sete dias de extração. No presente experimento, testou-se também 2 dias de extração e, na maioria dos casos, não houve diferença significativa de quando se manteve a alga e o solvente extrator por 7 dias. Esse resultado é interessante por demonstrar que, em termos de teor de compostos fenólicos, a extração possui a mesma eficiência quando feita com 2 e 7 dias de armazenamento; há possibilidade, portanto, de reduzir o tempo para o preparo dos extratos.

Tabela 1- Compostos fenólicos totais dos extratos de algas marinhas

Extração	Fenólicos Totais (mg AG/g alga)*			
	Nori	Kombu	Hijiki	Wakame
60% - 7 dias	6,61 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,04 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>b</sup>
60% - 2 dias	7,95 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,01 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,08 <sup>b</sup>
80% - 7 dias	5,40 ± 0,26 <sup>c</sup>	0,51 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,66 ± 0,12 <sup>a</sup>
80% - 2 dias	5,06 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>ab</sup>	2,84 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,13 <sup>a</sup>
100% - 7 dias	0,99 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,40 ± 0,29 <sup>a</sup>
100% - 2 dias	0,69 ± 0,24 <sup>d</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,51 ± 0,09 <sup>b</sup>

\* teor de compostos fenólicos totais expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g)  
Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3). Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

A comparação do teor de compostos fenólicos entre as algas pode ser observada na Figura 14. Para isso, foram eleitas as melhores combinações (alga x tempo de extração x solvente) considerando a vantagem do menor tempo de extração e uma maior proporção de água no solvente, o que promove a redução dos custos para a obtenção dos extratos.

As algas Nori e Hijiki apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, respectivamente, de 7,95 e 6,01 mg AG/g de alga.

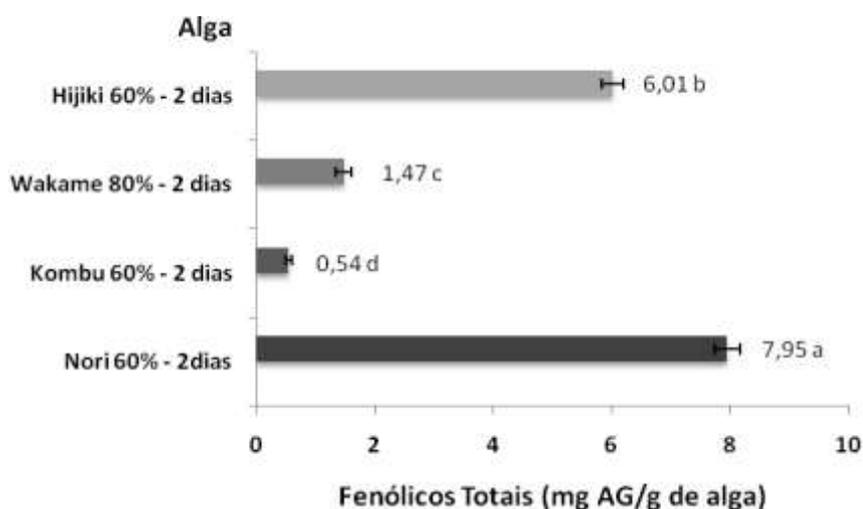


Figura 14- Concentração fenólica das algas, em relação às extrações consideradas mais eficientes

Teor de compostos fenólicos totais expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g)  
Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey  $p < 0,05$ )

Para os extratos da alga vermelha Nori e da alga parda Wakame foram encontrados, de acordo com Onofrejová et al. (2010), valores de compostos fenólicos de 0,0019 mg AG/g e 0,001 mg AG/g, respectivamente. Dentre os fenólicos, os autores verificaram altas concentrações de ácido p-hidroxibenzóico, ácido 2,3-diidroxibenzóico, 3,4-diidroxibenzaldeído, além de ácido salicílico, ácido cinâmico e caféico. Wang et al. (2009) encontraram para o teor de compostos fenólicos da alga vermelha *Rhodomela confervoides* cerca de 24 mg AG/g e Yuan, Bone e Carrington (2005) detectaram para a alga vermelha Dulse (*Palmaria palmata*) o teor de 1,03 mg AG/g.

Raymundo, Horta e Fett (2004) encontraram valores de fenólicos totais para a alga verde *Enteromorpha intestinalis* de 6,01mg AG/g, valor semelhante ao observado neste experimento para a alga parda Hijiki. Em 2006, Yuan e Walsh avaliaram o teor de compostos fenólicos da alga *Laminaria setchellii*, que pertence ao mesmo gênero da alga Kombu, da ordem de 1,84 mgAG/g.

#### **5.4 Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de algas marinhas**

Os extratos de algas foram avaliados com relação à capacidade de sequestrar radicais livres DPPH; estes têm sido extensivamente usados para avaliar substâncias redutoras com capacidade sequestrante de radicais livres de produtos naturais (WANG et al., 2009).

Observa-se na Tabela 2 que, para a maioria dos extratos, os melhores resultados, levando em consideração o menor tempo de extração, foram obtidos com dois dias de extração, com exceção de Nori, Kombu e Wakame que, quando extraídas com etanol 100% (v/v), alcançaram os melhores resultados, com 7 dias de extração. Pode-se verificar também que a resposta antioxidante foi dependente da concentração do extrato, já que os resultados mais expressivos foram obtidos com a maior concentração testada, que foi de 100 µg/mL.

Além disso, nota-se que as algas, ao serem extraídas com diferentes solventes, demonstram diferentes potenciais antioxidantes. Esse fato corrobora com os resultados encontrados por Duffy e Power (2001) e Ismail e Hong (2002).

Tabela 2- Atividade antioxidante dos extratos de algas marinhas, avaliada pelo método de sequestro de radicais livres DPPH

Extratos de algas	Atividade Antioxidante (%)			
	7 dias de extração		2 dias de extração	
	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Nori 60%	90,06 ± 0,1 <sup>a</sup>	90,68 ± 0,2 <sup>a</sup>	89,43 ± 0,1 <sup>a</sup>	90,68 ± 0,2 <sup>a</sup>
Nori 80%	82,52 ± 1,4 <sup>b</sup>	92,15 ± 0,1 <sup>a</sup>	83,25 ± 0,2 <sup>b</sup>	92,62 ± 0,3 <sup>a</sup>
Nori 100%	13,44 ± 0,3 <sup>c</sup>	30,15 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,02 ± 0,2 <sup>cd</sup>	22,92 ± 1,0 <sup>b</sup>
Hijiki 60%	81,12 ± 1,3 <sup>b</sup>	84,39 ± 0,4 <sup>b</sup>	75,22 ± 2,6 <sup>c</sup>	95,73 ± 0,4 <sup>a</sup>
Hijiki 80%	36,21 ± 1,7 <sup>b</sup>	59,83 ± 0,5 <sup>a</sup>	43,43 ± 3,5 <sup>b</sup>	63,25 ± 0,5 <sup>a</sup>
Hijiki 100%	1,09 ± 0,9 <sup>ab</sup>	4,12 ± 1,1 <sup>ab</sup>	4,89 ± 1,8 <sup>ab</sup>	5,29 ± 1,1 <sup>a</sup>
Kombu 60%	17,64 ± 1,4 <sup>b</sup>	34,73 ± 2,2 <sup>a</sup>	17,48 ± 1,9 <sup>b</sup>	30,69 ± 3,1 <sup>a</sup>
Kombu 80%	20,98 ± 2,9 <sup>b</sup>	32,79 ± 0,5 <sup>a</sup>	19,27 ± 1,9 <sup>b</sup>	32,64 ± 2,0 <sup>a</sup>
Kombu 100%	6,14 ± 2,6 <sup>bc</sup>	12,74 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,5 <sup>cd</sup>	6,76 ± 0,8 <sup>b</sup>
Wakame 60%	14,22 ± 2,8 <sup>bc</sup>	19,81 ± 0,2 <sup>ab</sup>	9,71 ± 3,8 <sup>cd</sup>	25,18 ± 0,8 <sup>a</sup>
Wakame 80%	18,49 ± 0,9 <sup>b</sup>	37,30 ± 0,2 <sup>a</sup>	17,17 ± 0,9 <sup>b</sup>	32,64 ± 1,2 <sup>a</sup>
Wakame 100%	5,21 ± 1,5 <sup>bc</sup>	9,71 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,27 ± 2,0 <sup>bcd</sup>	7,93 ± 1,2 <sup>ab</sup>

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3). Médias das linhas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

A comparação da atividade antioxidante avaliada pelo método de sequestro de radical livre DPPH entre os extratos mais potencialmente ativos e com menor tempo de extração (destacados na Tabela 2), e o padrão de atividade antioxidante utilizado ( $\alpha$ -tocoferol) está demonstrada na Figura 15. Os resultados revelaram que as algas Hijiki (etanol 60%, 2 dias de extração) e Nori (etanol 60% e 80%, 2 dias de extração) apresentaram potencial para sequestrar os radicais livres DPPH estatisticamente semelhantes ao padrão  $\alpha$ -tocoferol.

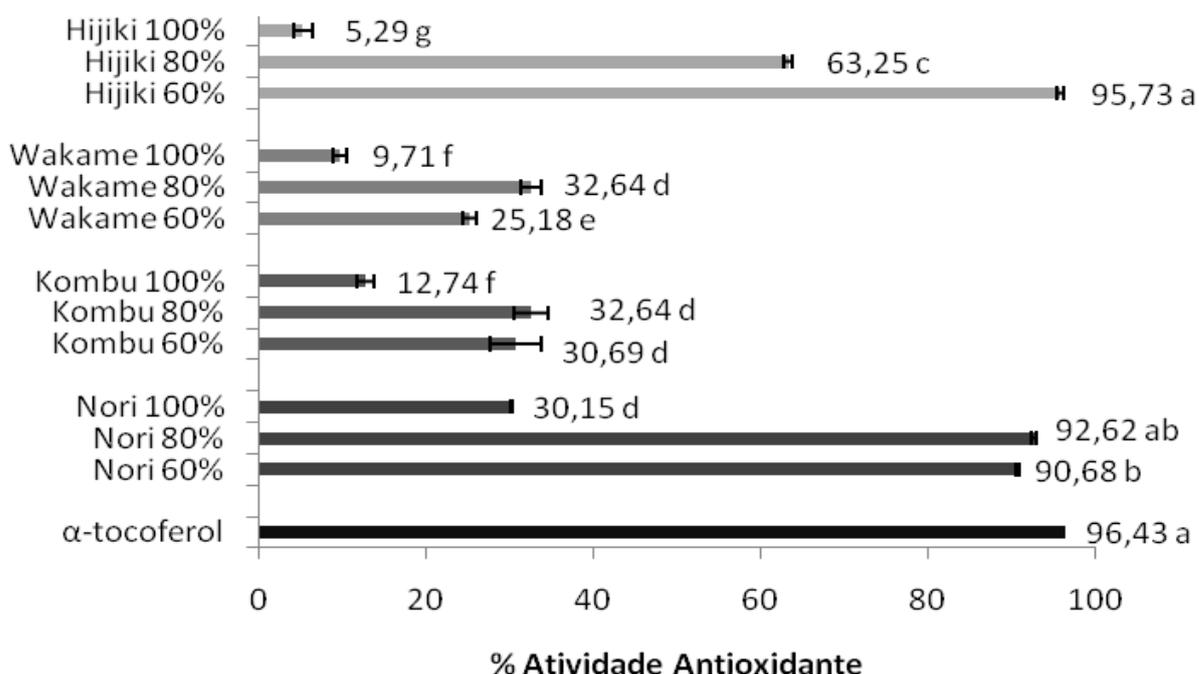


Figura 15- Atividade antioxidante das algas marinhas, pelo método do sequestro de radicais livres DPPH

Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey  $p < 0,05$ )

A habilidade para reduzir ou sequestrar radicais pode trazer benefícios para estender a vida útil de alimentos processados, durante a distribuição e o armazenamento destes (YUAN; BONE; CARRINGTON, 2005). Yan et al. (1999) avaliaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos das algas Wakame, Hijiki e Kombu e encontraram valores de 36,4%, 65,0% e 37,0% respectivamente, o que corrobora com os resultados obtidos neste experimento e apresentados na Figura 15. Duan et al. (2006) encontraram atividade antioxidante, para este mesmo método, de 67,9% para o extrato bruto da alga vermelha *Polysiphonia urceolata*. Wang et al. (2009) ao analisarem esta atividade em *Laminaria hyperborea*, alga de mesmo gênero da alga Kombu, detectaram 38,8% de atividade, valor sendo semelhante ao que pode ser observado na Figura 15, para Kombu extraída com etanol 60 e 80%.

Os extratos de algas também foram avaliados com relação à capacidade de inibir a oxidação acoplada ao sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. A Tabela 3 demonstra que na maioria dos extratos os melhores resultados, considerando a análise estatística e o tempo de extração, foram obtidos com dois dias de extração, com exceção da alga Hijiki. Este comportamento foi semelhante ao encontrado para

o método de sequestro de radicais livres DPPH. Pode-se verificar também que a resposta antioxidante foi parcialmente dependente da concentração do extrato, já que os resultados mais expressivos foram obtidos com a maior concentração testada, que foi de 100 µg/mL, com exceção de Hijiki (etanol 60% e 100%) e Wakame (etanol 80%).

Tabela 3- Atividade antioxidante dos extratos de algas pelo método da inibição da oxidação acoplada do sistema β-caroteno/ácido linoléico

Extratos de algas	Atividade Antioxidante (%)			
	7 dias de extração		2 dias de extração	
	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Nori 60%	*	46,61 ± 2,1 <sup>b</sup>	37,28 ± 5,9 <sup>b</sup>	61,18 ± 5,5 <sup>a</sup>
Nori 80%	*	4,41 ± 1,4 <sup>c</sup>	14,6 ± 1,4 <sup>b</sup>	49,67 ± 8,1 <sup>a</sup>
Nori 100%	*	*	13,74 ± 1,5 <sup>ab</sup>	14,92 ± 1,6 <sup>a</sup>
Hijiki 60%	20,99 ± 2,1 <sup>a</sup>	21,66 ± 2,3 <sup>a</sup>	12,83 ± 0,5 <sup>b</sup>	18,03 ± 1,5 <sup>a</sup>
Hijiki 80%	19,13 ± 3,2 <sup>ab</sup>	24,73 ± 1,9 <sup>a</sup>	11,71 ± 2,1 <sup>cd</sup>	14,37 ± 1,9 <sup>bc</sup>
Hijiki 100%	14,57 ± 2,2 <sup>a</sup>	12,03 ± 1,9 <sup>ab</sup>	6,77 ± 0,4 <sup>cd</sup>	3,38 ± 1,0 <sup>d</sup>
Kombu 60%	53,68 ± 3,1 <sup>c</sup>	58,83 ± 6,5 <sup>bc</sup>	68,68 ± 3,0 <sup>ab</sup>	73,19 ± 4,4 <sup>a</sup>
Kombu 80%	30,21 ± 4,6 <sup>cd</sup>	45,31 ± 4,2 <sup>b</sup>	40,21 ± 1,3 <sup>bc</sup>	62,84 ± 4,5 <sup>a</sup>
Kombu 100%	18,23 ± 4,0 <sup>cd</sup>	27,0 ± 1,5 <sup>ab</sup>	22,5 ± 3,3 <sup>bc</sup>	33,06 ± 1,9 <sup>a</sup>
Wakame 60%	*	2,26 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,77 ± 2,1 <sup>b</sup>	21,19 ± 1,5 <sup>a</sup>
Wakame 80%	*	4,72 ± 1,1 <sup>b</sup>	23,81 ± 2,5 <sup>a</sup>	23,68 ± 5,7 <sup>a</sup>
Wakame 100%	*	*	8,69 ± 1,2 <sup>b</sup>	11,71 ± 0,7 <sup>a</sup>

Valores representam as médias (n=3)

Médias das linhas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05)

\* atividade não detectada

A comparação da atividade antioxidante pela inibição da oxidação acoplada do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico entre os extratos mais potencialmente ativos, e com menor tempo de extração, e o padrão de atividade antioxidante utilizado ( $\alpha$ -tocoferol) pode ser feita ao observar a Figura 16. Os resultados revelaram que a alga Kombu (etanol 60%) apresentou potencial de inibição da peroxidação lipídica estatisticamente semelhante ao padrão  $\alpha$ -tocoferol, seguida pela Nori (etanol 60%).

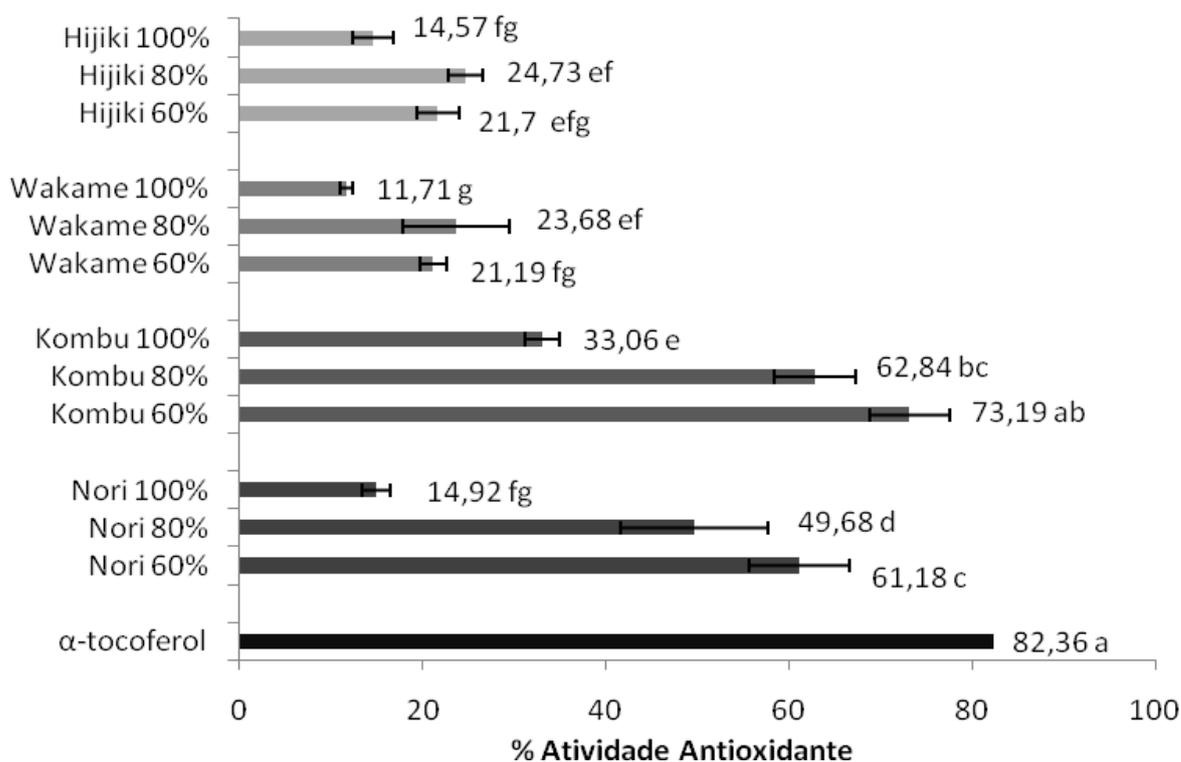


Figura 16- Atividade antioxidante das algas marinhas, pelo método da oxidação acoplada do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey  $p < 0,05$ )

Ismail e Hong (2002) avaliaram a atividade antioxidante por meio do método do  $\beta$ -caroteno de extratos aquosos de Nori, Kombu, Wakame e Hijiki e encontraram valores, respectivamente, de 51%, 54%, 31% e 46%. Diferenças entre os resultados da atividade antioxidante podem acontecer por diversas causas, como a concentração da amostra e o método de determinação (CABRAL et al., 2009).

Para o extrato metanólico da alga vermelha *Rhodomela confervoides*, o poder antioxidante encontrado foi de 84% (WANG et al., 2009) e de 97,3% para o extrato metanólico da alga vermelha *Polysiphonia urceolata* (DUAN et al., 2006), sendo que ambos resultados foram dose-dependentes.

A atividade antioxidante determinada pelo teste de sequestro do radical DPPH, neste experimento, parece não seguir o mesmo comportamento quando determinada pelo método de descoloração do  $\beta$ -caroteno, com exceção à alga Nori, que apresentou alta atividade antioxidante nos dois métodos utilizados. Estas diferenças podem estar relacionadas com o fato de que, em sistemas lipofílicos, as taxas de reações de sequestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos, entre a fase aquosa e lipídica e, desta forma, reduzir a disponibilidade dos compostos polares para reação com o radical não-polar  $\text{LOO}\cdot$  (CABRAL et al., 2009).

A correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos mais bioativos foi analisada. Para a atividade sequestradora do radical livre DPPH, a correlação apresentou-se positiva, de moderada a forte ( $r=0,92$ ). Uma correlação mais baixa, porém ainda positiva ( $r=0,27$ ) foi observada entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante pela oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (Tabela 4).

Tabela 4- Coeficiente de correlação (r) entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante

Correlação	r
DPPH x compostos fenólicos	0,92
Oxidação do ácido linoléico x compostos fenólicos	0,27

A correlação positiva indica que os compostos fenólicos possuem importante função na atividade antioxidante apresentada pelos extratos de algas marinhas, mas certamente, outros fatores também estão envolvidos. Esta correlação positiva entre o teor de polifenóis de algas e a atividade antioxidante tem sido comprovada pelos trabalhos de Yen e Duth (1993), Siriwardhana et al. (2003), Karawita et al. (2005), Athukorala et al. (2006), Cabral et al. (2009) e Cabral et al. (2010).

Takamatsu et al. (2003) atribuíram a atividade antioxidante dos organismos marinhos à presença de clorofilas, carotenóides e derivados de tocoferol, como a vitamina E e, também, a isoprenóides, que são estruturalmente relatados como antioxidantes derivados de plantas. De acordo com Yan et al. (1999), a fucoxantina é o carotenóide mais encontrado em *Hijikia fusiformis* (Hijiki) e em *Undaria pinnatifida* (wakame) (PRABHASANKAR et al., 2009) e é conhecido pelas suas propriedades antioxidantes. Yuan, Bone e Carrington (2005) descreveram que as algas são conhecidas por possuírem moléculas antioxidantes, tais como carotenóides (fucoxantina,  $\alpha$ - e  $\beta$ - caroteno), catequinas (catequina, epigallocatequina e epigallocatequina galato), florotaninos (floroglucinol, eckol) e tocoferóis ( $\alpha$ -, $\gamma$ -, $\delta$ - tocoferol).

### **5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos de algas marinhas**

Com relação aos testes de atividade antimicrobiana, após o período de incubação foi possível observar, pela Tabela 5, que os extratos etanólicos de algas marinhas não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Com relação às bactérias *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), observou-se que todos os extratos etanólicos a 100% (v/v) apresentaram atividade inibitória, independente do tempo de extração. Dos extratos obtidos com etanol 80% (v/v), apenas os extratos das algas Hijiki e Kombu, com 7 dias de extração, apresentaram inibição à *K. pneumoniae*, enquanto o extrato da alga Kombu, extraído por 2 dias, apresentou atividade inibitória contra *L. monocytogenes*.

Tabela 5- Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos de algas marinhas

	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Nori 60%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Nori 80%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Nori 100%; 2d	nd	nd	nd	78,12-156,25	39,06-78,12
Nori 60%; 7d	nd	nd	nd	nd	Nd
Nori 80%; 7d	nd	nd	nd	nd	Nd
Nori 100%; 7d	nd	nd	nd	19,53 - 39,06	39,06-78,12
Hijiki 60%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Hijiki 80%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Hijiki 100%; 2d	nd	nd	nd	19,53 - 39,06	19,53-39,06
Hijiki 60%; 7d	nd	nd	nd	nd	Nd
Hijiki 80%; 7d	nd	nd	nd	312,5 -625	Nd
Hijiki 100%; 7d	nd	nd	nd	78,12-156,25	78,12-156,25
Wakame 60%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Wakame 80%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Wakame 100%; 2d	nd	nd	nd	19,53 - 39,06	19,53-39,06
Wakame 60%; 7d	nd	nd	nd	nd	Nd
Wakame 80%; 7d	nd	nd	nd	nd	Nd
Wakame 100%; 7d	nd	nd	nd	39,06- 78,12	19,53-39,06
Kombu 60%; 2d	nd	nd	nd	nd	Nd
Kombu 80%; 2d	nd	nd	nd	nd	2500-5000
Kombu 100%; 2d	nd	nd	nd	19,53 - 39,06	19,53-39,06
Kombu 60%; 7d	nd	nd	nd	nd	Nd
Kombu 80%; 7d	nd	nd	nd	1250-2500	Nd
Kombu 100%; 7d	nd	nd	nd	19,53 - 39,06	39,06-78,12

\* nd: atividade não detectada nas concentrações máximas testadas. 2 d: 2 dias de extração; 7d: 7 dias de extração.

Não houve relação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antimicrobiana dos extratos. Apesar do etanol a 60 e 80% (v/v) terem sido os sistemas de solventes que extraíram os maiores teores de compostos fenólicos, esses extratos não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas.

Em termos de CIM, um questionamento comum em muitos artigos é o relacionado às altas concentrações de extrato bruto utilizadas no teste. De acordo com Ríos e Recio (2005), a ocorrência de atividade interessa nos casos de concentrações abaixo de 100 µg/mL para extratos brutos e de 10 µg/mL para compostos isolados.

Com base nestes dados, é possível afirmar que vários extratos brutos de algas marinhas, de acordo com a Tabela 5, podem ser considerados bioativos, já que apresentaram atividade inibitória em concentrações menores que 100 µg/mL. Podem ser evidenciados os extratos 100% etanólicos de Nori (7 dias), Hijiki (2 dias), Wakame (2 dias) e Kombu (7 dias e 2 dias), que apresentaram melhor desempenho, com CIM entre 19,53 e 39,06 µg/mL, para *Klebsiella pneumoniae*.

O efeito antimicrobiano de extratos hexânico e metanólico das algas *Mastocarpus stellatus*, *Laminaria digitata* e *Ceramium rubrum* foram investigados por Dubber e Harder (2008). O extrato metanólico de *C. rubrum* a 10 mg/ml e o extrato hexânico de *L. digitata*, a 31 mg/ml, inibiram todas as bactérias testadas, apesar de serem considerados, de acordo com Ríos e Récio (2005), de altas concentrações para serem utilizadas em testes de atividade antimicrobiana (BANSEMIR et. al., 2006).

A análise da CBM foi realizada apenas com as bactérias que apresentaram resultado positivo quanto à Concentração Inibitória Mínima. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 6.

Os extratos etanólicos das algas marinhas apresentaram atividade bactericida somente contra *Klebsiella pneumoniae*, sendo todos os extratos bioativos obtidos a partir de solução etanólica 100% (v/v), independentemente do tempo de extração, e o de Kombu à concentração de 80% (v/v), com 7 dias de extração.

Tabela 6- Concentração Bactericida Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos de algas marinhas

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Nori 60%; 2d	-	-
Nori 80%; 2d	-	-
Nori 100%; 2d	78,12-156,25	nd
Nori 60%; 7d	-	-
Nori 80%; 7d	-	-
Nori 100%; 7d	19,53 - 39,06	nd
Hijiki 60%; 2d	-	-
Hijiki 80%; 2d	-	-
Hijiki 100%; 2d	39,06-78,12	nd
Hijiki 60%; 7d	-	-
Hijiki 80%; 7d	nd	-
Hijiki 100%; 7d	156,25-312,5	nd
Wakame 60%; 2d	-	-
Wakame 80%; 2d	-	-
Wakame 100%; 2d	19,53-39,06	nd
Wakame 60%; 7d	-	-
Wakame 80%; 7d	-	-
Wakame 100%; 7d	39,06-78,12	nd
Kombu 60%; 2d	-	-
Kombu 80%; 2d	-	nd
Kombu 100%; 2d	19,53-39,06	nd
Kombu 60%; 7d	-	-
Kombu 80%; 7d	1250-2500	-
Kombu 100%; 7d	19,53 - 39,06	nd

nd: atividade não detectada. 2 d: 2 dias de extração; 7d: 7 dias de extração.

As diferentes atividades encontradas podem ser explicadas pelo fato de que a ação antimicrobiana dos compostos bioativos, geralmente presentes nas algas, está relacionada à inativação de enzimas e às mudanças na permeabilidade das membranas celulares dos microrganismos. O efeito antimicrobiano de produtos

naturais torna-se, assim, específico para cada espécie de microrganismo utilizado (CARPES et al., 2009).

Apesar de haver relatos na literatura a respeito do efeito sinérgico entre extratos de produtos naturais, este fato não foi observado para os extratos de algas marinhas Nori, Kombu, Hijiki e Wakame, extraídos por 2 dias, com etanol 100%, contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). No teste, todos os poços apresentaram modificação na cor da Resazurina, evidenciando crescimento bacteriano.

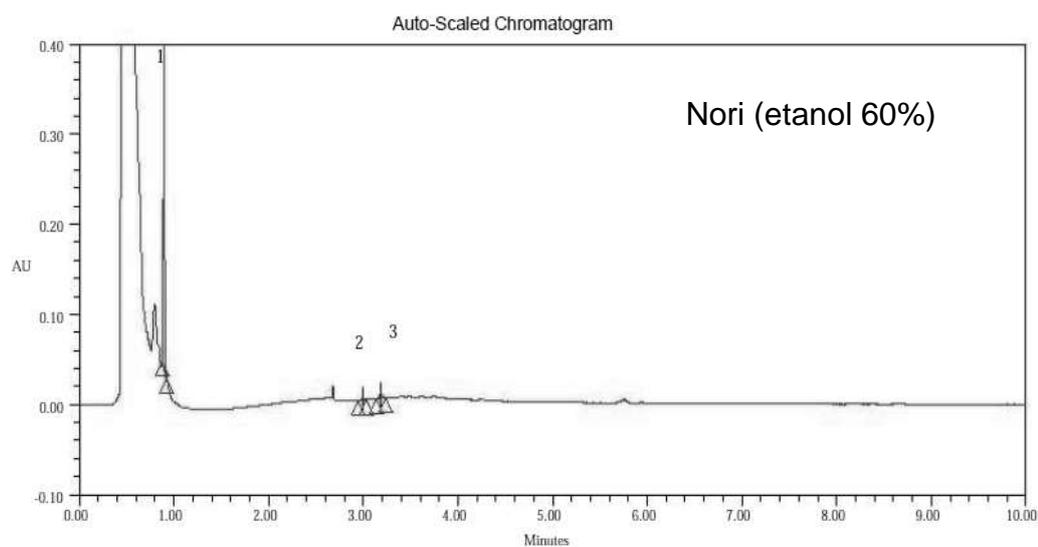
Apesar dos compostos fenólicos das algas não serem, aparentemente, os responsáveis pela atividade antimicrobiana, esses compostos estão intimamente relacionados à atividade antioxidante dos extratos das algas marinhas. Com a divergência entre os resultados de atividade biológica, surge a hipótese de que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de algas marinhas podem não ser os mesmos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Seria interessante que as pesquisas futuras nesta área se direcionassem ao isolamento e identificação dos compostos biologicamente ativos, de forma a estabelecer marcadores químicos para as algas marinhas, tornando a aplicação deste produto natural mais específica na indústria de alimentos e farmacêutica.

## **5.6 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)**

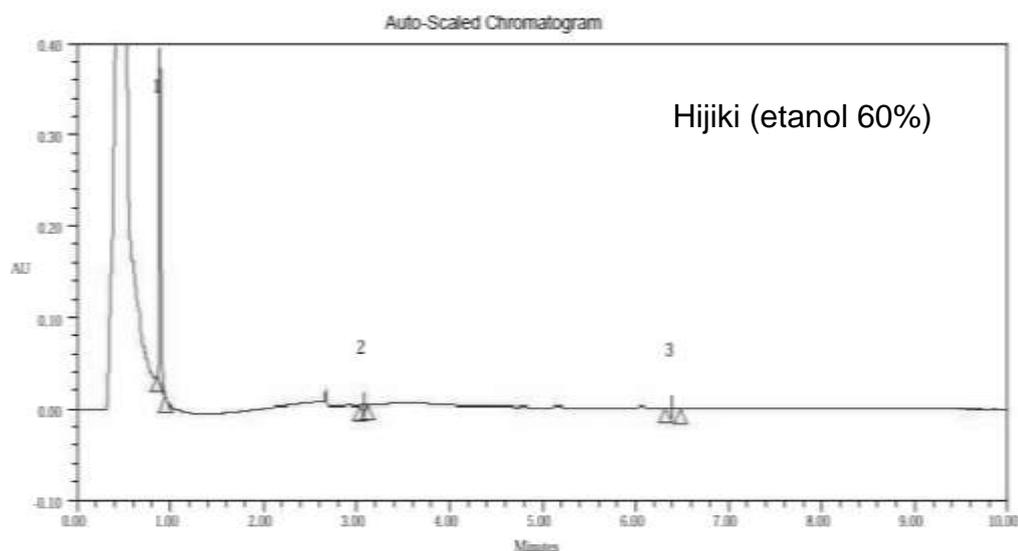
Os compostos fenólicos têm sido muito estudados devido a sua influência na qualidade dos alimentos. Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois além de englobarem muitas substâncias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas, estes compostos apresentam, na maioria, polaridade elevada, são muito reativos e suscetíveis à ação de enzimas (SOARES, 2002).

A UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica que tem gerado novas possibilidades na cromatografia líquida, especialmente no que concerne à diminuição no tempo de análise e no consumo de solventes. De acordo com Novaková, Matysová e Solich (2006), em UPLC é possível manter a resolução e sensibilidade dos resultados, em termos comparativos à HPLC.

Na Figura 17 estão apresentados os cromatogramas das algas Nori e Hijiki, extraídas com etanol 60%, durante 2 dias. Estas algas foram escolhidas por apresentarem os maiores teores de compostos fenólicos, além de expressiva atividade antioxidante *in vitro*. Com os padrões de compostos fenólicos utilizados, foi possível detectar a presença, na alga Nori, dos ácidos clorogênico (2,91g/100g), vanílico (383 mg/kg) e caféico (382 mg/kg). Na alga Hijiki foram detectados os ácidos clorogênico (3,53g/100g), caféico (104 mg/kg) e 2- hidroxí-cinâmico (403 mg/kg).



1- Ácido clorogênico; 2- Ácido vanílico; 3- Ácido caféico



1- Ácido clorogênico; 2- Ácido caféico; 3- Ácido cinâmico

Figura 17- Cromatogramas das algas marinhas Nori e Hijiki, obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência

Onofrejová et al. (2010) analisaram a composição química da alga Nori, por HPLC, e detectaram a presença dos ácidos clorogênico, caféico, cumárico e hidroxibenzóico. Os autores não encontraram o ácido vanílico nesta alga.

No caso do ácido vanílico, a metoxila adjacente à hidroxila na sua fórmula confere a ele atividade antioxidante. Com referência ao ácido cinâmico, presente na alga Hijiki, a presença de uma metoxila adjacente à hidroxila, aumenta o período de indução da oxidação, duas vezes, em relação ao controle. Entretanto, o maior potencial antioxidante foi encontrado quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4, estrutura apresentada pelo ácido caféico, sendo sua atuação antioxidante maior que a do BHT. Essas informações levam ao melhor esclarecimento da ação destes antioxidantes no processo oxidativo (SOARES, 2002).

### **5.7 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM)**

A utilização da técnica de CG-EM tem sido amplamente empregada na análise da composição química de produtos naturais, principalmente na determinação de compostos voláteis, ácidos fenólicos, açúcares e aminoácidos (PRADO, 2009).

No presente trabalho, os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos, a 60% (v/v), com dois dias de extração, das algas Nori e Hijiki estão demonstrados, respectivamente, nas Figuras 18 e 19, seguidas das respectivas identificações dos picos e dos principais fragmentos dos íons dos compostos não identificados (Tabelas 7 e 8).

A alga Nori apresentou, na sua composição química (Tabela 7), aminoácidos essenciais (glicina e valina) e não essenciais (L-alanina e prolina), além do éster trimetilsilil do ácido glutamínico. Foi observada a presença de açúcares, como a D- glicose e glicopirranose (molécula de glicose com estrutura na forma de anel), e um poliol. O composto majoritário, representado pelo pico 16, não foi identificado de acordo com os dados da biblioteca do equipamento.

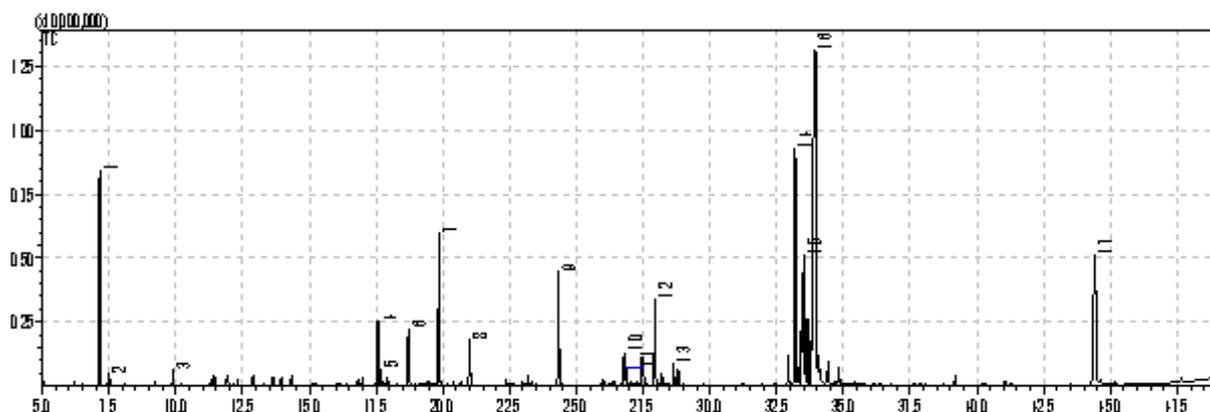


Figura 18- Perfil cromatográfico, em CG-EM, do extrato etanólico da alga marinha Nori. A identificação dos picos está descrita na Tabela 7

Tabela 7- Compostos identificados e fragmentos dos íons ( $m/z$ , em %) do extrato etanólico da alga Nori

Pico	Identificação	$m/z$	% Área	TR (min)
1	L- alanina	45 (6,4); 73 (49,6); 116 (100); 147 (13,6); 190 (3,6); 218 [ $M^+$ ]	8,16	7,8
2	glicina	45 (13,6); 73 (57,6); 102 (100); 147 (34,8); 176 (7,6); 204 [ $M^+$ ]	0,35	8,2
3	valina	45 (4,8); 73 (42); 100 (5,6); 144 (100); 218 (17,6); 246 [ $M^+$ ]	0,48	10,8
4	prolina	45 (12,8); 73 (42); 100 (5,6); 144 (100); 218 (17,6); 246 [ $M^+$ ]	3,05	17,5
5	n.i.	45 (10,63); 56 (26,6); 73 (34,6); 75 (36,5); 84 (100); 147 (13,6); 158 (33,07); 174 (82); 186 (11,5); 230 (13,9); 276 [ $M^+$ ]	0,58	17,8
6	ácido propanóico	45 (8,8); 73 (100); 102 (19,2); 130 (9,2); 147 (60,4); 189 (37,2); 205 (14,4); 217 (2,4); 292 (31,2); 307 [ $M^+$ ]	2,18	18,7
7	éster trimetilsilil do ácido	45 (5,6); 73 (49,2); 84 (14); 100 (5,6); 128 (25,6); 147 (20); 230 (10); 246 (100); 320	6,42	19,9

(continua)

(continuação)

	glutamínico	(1,2); 348 [M <sup>+</sup> ]		
8	n.i.	45 (3,2); 55 (9,5); 73 (10,5); 82 (52,2); 184 (7,8); 200 (100); 228 (4,3); 317 [M <sup>+</sup> ]	2,01	21,1
9	éster trimetilsilil do ácido 1,1-difenil-4-carboxílico	45 (8,8); 73 (100); 129 (3,6); 147 (56,4); 211 (8); 273 (84); 305 (6,4); 347 (20,4); 363 (26,8); 375 (24); 465 [M <sup>+</sup> ]	4,61	24,5
10	n.i.	45 (7,5); 73 (100); 75 (61,8); 159 (57,2); 191 (25,1); 217 (95,7); 231 (21,1); 359 (7,5); 377 [M <sup>+</sup> ]	1,2	26,7
11	D- glucitol (sorbitol)	45 (4,4); 73 (100); 103 (22); 129 (6); 147 (35,2); 205 (32,8); 217 (25,2); 319 (61,2); 421 [M <sup>+</sup> ]	0,64	26,8
12	n.i.	73 (42,5); 147 (20,5); 191 (11,2); 217 (100); 305 (14,6); 318 (18,8); 359 (8,3); 539 [M <sup>+</sup> ]	3,77	27,9
13	éster trimetilsilil do ácido palmítico	43 (30); 55 (19,2); 73 (63,2); 75 (55,2); 117 (80); 129 (36); 132 (60); 145 (27,2); 201 (11,2); 313 (100); 328 [M <sup>+</sup> ]	0,99	28,6
14	D- glicose	45 (6,4); 73 (90,4); 103 (10,4); 204 (100); 217 (14,8); 361 (17,2); 521 [M <sup>+</sup> ]	11,54	33,17
15	glicopirranose	45 (6,4); 73 (90,4); 103 (10,4); 117 (12,4); 129 (12,4); 147 (22,4); 169 (2,4); 204 (100); 217 (51,2); 246 (15,2); 363 [M <sup>+</sup> ]	5,83	33,4
16	n.i.	73 (49,8); 103 (16,1); 147 (16,5); 204 (100); 217 (25,7); 337 (34,1); 361 (7,3); 581 [M <sup>+</sup> ]	36,72	33,9
17	n.i.	73 (50,7); 117 (30,2); 147 (9,2); 277 (10,8); 319 (12,8); 395 (32,7); 410 (100); 500 (46,2); 572 (49,4); 616 [M <sup>+</sup> ]	11,47	44,4

m/z: fragmentos dos íons, por relação massa/carga, em porcentagem.

TR: tempo de retenção, em minutos

[M<sup>+</sup>]: íon molecular

n.i.: composto não identificado

A alga Hijiki apresentou composição química mais complexa que a alga Nori. Foi possível observar, na Tabela 8, ácidos carboxílicos (propanóico e acético) e ésteres (éster do ácido succínico); aminoácidos não essenciais (L-alanina e L-prolina); monossacarídeo (frutose); ésteres de ácidos graxos saturados (mirístico, palmítico) e um ácido graxo insaturado (ácido linoléico), além de polióis, como o xilitol e ribitol, como compostos majoritários (picos 9 e 10, respectivamente).

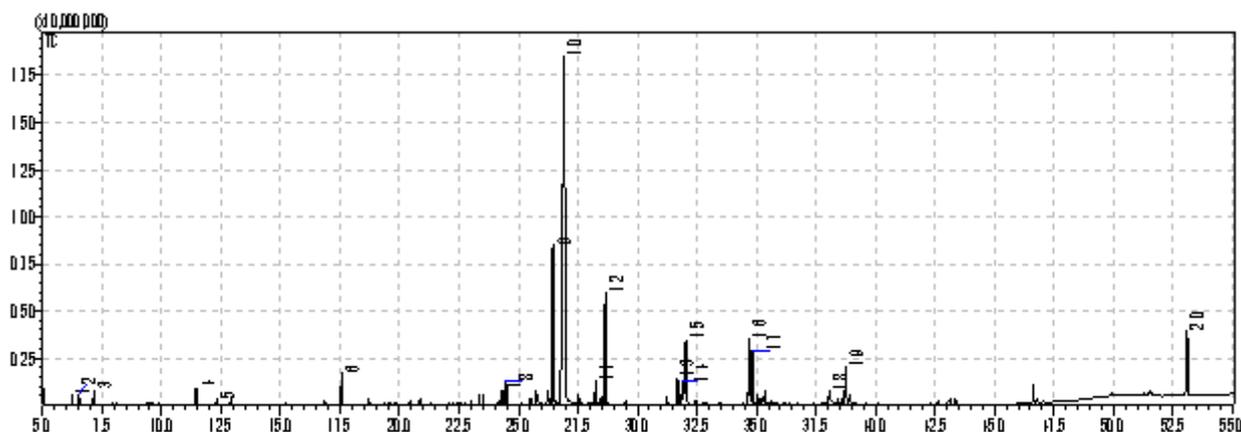


Figura 19- Perfil cromatográfico, em CG-EM, do extrato etanólico da alga Hijiki. A identificação dos picos está descrita na Tabela 8

Tabela 8- Compostos identificados e fragmentos dos íons ( $m/z$ , em %) do extrato etanólico da alga Hijiki

Pico	Identificação	$m/z$	% Área	TR (min)
1	ácido propanóico	45 (19,6); 66 (16); 73 (100); 117 (90); 147 (86); 190 (21,6); 219 [ $M^+$ ]	0,4	6,2
2	ácido acético	45 (7,6); 66 (8,4); 73 (62,4); 133 (7,6); 147 (100); 148 (16); 149 (9,6); 161 (8,4); 177 (19,2); 205 [ $M^+$ ]	0,44	6,5
3	L- alanina	45 (6,4); 73 (49,6); 116 (100); 147 (13,6); 218 [ $M^+$ ]	0,63	7,14
4	n.i.	45 (11,3); 73 (93,17); 103 (22,4); 117 (26,9); 133 (23,1); 147 (72); 191 (1,9); 205 (38); 218 (14,6); 283 (8); 299 (100), 314 [ $M^+$ ]	0,93	11,4

(continua)

(continuação)

5	éster trimetilsilil do ácido butanodióico (ácido succínico)	45 (7,6); 55 (8); 73 (55,6); 75 (18); 129 (4); 147 (100); 148 (15); 247 [M <sup>+</sup> ]	0,27	12,3
6	L- prolina	45 (12,8); 73 (78); 147 (19,2); 156 (100); 230 (8); 258 [M <sup>+</sup> ]	1,82	17,7
7	D-frutose	45 (5,2); 73 (94,4); 103 (10,8); 117 (6); 147 (27,2); 204 (24,8); 217 (100); 219 (12); 437 [M <sup>+</sup> ]	0,84	24,4
8	éster trimetilsilil do ácido tetradecanóico (ácido mirístico)	43 (29,6); 55 (25,2); 73 (100); 75 (76,8); 117 (68,4); 132 (38,8); 145 (22,4); 285 [M <sup>+</sup> ]	1,22	24,6
9	xilitol	45 (4); 73 (100); 103 (46,8); 129 (16,4); 147 (38,4); 205 (34); 217 (62); 307 [M <sup>+</sup> ]	11,57	26,8
10	ribitol	73 (100); 103 (14); 129 (16); 147 (30); 189 (11,2); 205 (36); 217 (39,2); 307 (19,2); 319 [M <sup>+</sup> ]	49,13	27,57
11	éster trimetilsilil do ácido palmitelaídico	41 (40); 55 (50,4); 73 (100); 75 (94,4); 96 (18,8); 117 (64); 129 (50); 145 (28,8); 311 [M <sup>+</sup> ]	1,24	28,3
12 e 18	éster trimetilsilil do ácido palmítico	43 (30); 73 (63,2); 75 (55,2); 117 (80); 129 (36); 145 (27,2); 201 (11,2); 313 (100); 328 [M <sup>+</sup> ]	7,79	28,6 e 38,7
13	n.i.	41 (25,6); 67 (46); 75 (73,2); 78 (18,5); 91 (64,9); 105 (46,9); 119 (43,6); 147 (28,2); 161 (17,8); 171 (12,3); 189 [M <sup>+</sup> ]	1,39	31,6
14	ácido 9,12-octadienóico (ácido linoléico)	41 (26,4); 55 (44,8); 67 (65,6); 73 (95,6); 75 (100); 95 (50,4); 117 (35,6); 129 (32); 150 (18); 178 (16,4); 262 (24); 337 [M <sup>+</sup> ]	1,31	32,5

(continua)

(continuação)

15	n.i.	41 (24,2); 55 (29,8); 67 (56,8); 73 (80,8); 75 (94); 79 (100); 95 (65,8); 108 (56,6); 129 (50); 135 (36,3); 173 (16,5); 260 (6,7); 335 [M <sup>+</sup> ]	5,83	31,6
16	n.i.	55 (31,5); 67 (62,7); 73 (92,9); 79 (100); 91 (78,7); 117 (75,2); 133 (55,9); 150 (35,8); 175 (24,1); 217 (11,5); 376 [M <sup>+</sup> ]	4,05	35,9
17	n.i.	41 (25,9); 73 (81,8); 79 (100); 91 (84,7); 117 (77,6); 131 (51,5); 145 (33); 215 (13,3); 345 [M <sup>+</sup> ]	3,09	35,5
19	monoéster bis-O-trimetilsilil glicerina do ácido palmítico	57 (26,4); 73 (40,8); 147 (30,8); 203 (20); 239 (28); 313 (4,4); 371 (100); 459 [M <sup>+</sup> ]	2,57	38,3
20	n.i.	55 (27,8); 69 (25,7); 95 (25,8); 129 (63,6); 211 (20,2); 281 (52m3); 296 (91,8); 386 (100); 503 [M <sup>+</sup> ]	5,48	54,06

m/z: fragmentos dos íons, por relação massa/carga, em porcentagem.

TR: tempo de retenção, em minutos

[M<sup>+</sup>]: íon molecular

n.i.: composto não identificado

Prabhasankar et al. (2009) relataram que as algas marinhas possuem em sua composição química diversos compostos, como polissacarídeos, proteínas e aminoácidos. Aguilera-Morales et al (2005) relataram a presença de 9 aminoácidos essenciais na alga *Enteromorpha spp.*, em teores semelhantes aos encontrados em soja, além de ácidos graxos, como ômega 3 e ômega 6. As algas Nori e Hijiki também apresentaram, por CG-EM, aminoácidos essenciais e não essenciais; açúcares, como a glicose, frutose e glicopiranoose; e ésteres dos ácidos graxos mirístico e palmítico, além do ácido linoléico.

Qi et al. (2005) reportaram que os açúcares extraídos da alga *Ulva pertusa* mostraram excelente atividade sequestrante contra radicais superóxido e hidroxil. Estes compostos possuem atividade antioxidante devido à facilidade de abstração

do hidrogênio anomérico das suas unidades monossacarídicas internas (ATHUKORALA et al., 2006). Polissacarídeos e seus derivados possuem numerosas aplicações na indústria alimentícia, química e farmacêutica. O grande potencial de exploração desses biopolímeros naturais tem estimulado os pesquisadores na busca de novos polissacarídeos (ZHANG et al., 2004).

Os compostos majoritários da alga Hijiki, ribitol e xilitol são classificados como polióis. Os polióis são formados a partir da conversão do grupo carbonílico de unidades monossacarídicas em álcoois, constituindo, dessa maneira, poliálcoois. Estes compostos são considerados como principais responsáveis pela manutenção da pressão osmótica e de turgescência das algas marinhas (ASCENCIO, 2006). O sorbitol, encontrado na alga Nori, é o poliól mais amplamente encontrado na natureza, ocorrendo em maçãs, pêras, pêsegos, ameixas, cerejas e algas marinhas. É obtido industrialmente através da hidrólise do amido, seguida de hidrogenação catalítica da D-glicose. Esses polióis apresentam poder espessante e edulcorante, são inibidores de cristalização e possuem atividade antioxidante e crioprotetora (VIGGIANO, 2003).

### **5.8 Atividade antioxidante dos extratos de algas por métodos acelerados**

A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, com implicação direta no valor comercial dos alimentos. Nos últimos anos, a preocupação constante em proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos, sendo uma das mais utilizadas o uso de substâncias com capacidade antioxidante (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

As pesquisas atuais visam avaliar os ácidos graxos pela determinação do seu grau de oxidação e também avaliar a capacidade antioxidante de novos compostos; a diversidade de métodos analíticos propostos na literatura para estes fins leva, no entanto, a dificuldades de escolha.

O método do Rancimat é um método de oxidação acelerada e se baseia na determinação automática do tempo decorrido para se atingir a taxa máxima de oxidação de um óleo. Esse tempo, também chamado de período de indução ou índice de estabilidade do óleo, é determinado pela medida do aumento da condutividade da água deionizada, devido aos compostos finais de oxidação que nela são borbulhados (FARHOOSH, 2007).

O período de indução é um parâmetro comparativo muito utilizado para controle de qualidade de matérias-primas e de processos, para se avaliar diferentes tipos de óleos para fritura, alterações na composição em ácidos graxos, eficiência da adição de antioxidantes, entre outros (ANTONIASSI, 2001).

O tempo necessário para a ocorrência da taxa máxima de oxidação do óleo de soja, sem a adição de antioxidantes (controle), foi de 7,05 h, como mostra a Tabela 9. O tempo requerido para a formação de radicais livres, moléculas altamente reativas, que desencadeiam o processo de oxidação (fase de iniciação), foi maior no óleo de soja adicionado dos extratos de algas marinhas, o que atrasou o início da fase de propagação e, conseqüentemente, a fase de terminação da oxidação.

A alga Nori apresentou efeito antioxidante dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração do extrato aplicada no óleo, maior o período de indução desenvolvido, sendo que para 100 µg/mL, o período de indução foi de 8,72 h. A alga Hijiki apresentou efeito contrário, sendo observado efeito pró-oxidante na maior concentração testada, com período de indução de 3,39 h. Sendo assim, os extratos de algas marinhas, com exceção de Hijiki, 100 µg/mL, protegeram o óleo e cada um deles exibiu um fator de proteção. Todos os tratamentos com extratos de algas, com ação antioxidante, apresentaram fator de proteção maior que o exibido pelo BHT (Tabela 9).

Tabela 9- Período de indução e fator de proteção das amostras de óleo de soja analisadas no Rancimat

Tratamentos	Período de Indução (horas)	Fator de Proteção
Sem antioxidante	7,05 ± 0,06 <sup>d</sup>	-
BHT: 100 µg/mL	7,31 ± 0,02 <sup>cd</sup>	1,03
Nori: 25 µg/mL	8,28 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,17
Nori: 50 µg/mL	8,63 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,22
Nori: 100 µg/mL	8,72 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,23
Hijiki: 25 µg/mL	7,58 ± 0,23 <sup>c</sup>	1,07
Hijiki: 50 µg/mL	7,46 ± 0,07 <sup>cd</sup>	1,06
Hijiki: 100 µg/mL	3,39 ± 0,09 <sup>e</sup>	0,48

Médias (n=3) e desvio padrão estão indicados. Letras diferentes indicadas diferem estatisticamente em nível de 5% (Teste de Tukey)

Deste modo, os extratos de algas exerceram boa proteção contra a oxidação e, o seu efeito protetor em sistemas oleosos, pode ser atribuído às propriedades dos compostos fenólicos, cuja capacidade doadora de hidrogênio e a inibição da oxidação aumentam com o aumento no número de grupos hidroxilas presentes na molécula (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Não foram encontrados na literatura, para efeito de comparação, trabalhos que avaliassem a atividade antioxidante de algas marinhas em óleos, pelo método do Rancimat. De acordo com Bergamaschi (2010), a atividade antioxidante de extratos de dez resíduos agroindustriais, tais como película de amendoim e talo de beterraba, apresentaram fatores de proteção variando ente 0,21 a 1,13.

O método do Oxipres também é considerado um método acelerado e o processo de oxidação é monitorado pelo consumo de oxigênio, o qual é registrado através das mudanças na pressão, em um recipiente hermeticamente fechado contendo este gás (REBLOVÁ, 2006). A oxidação do produto é acelerada devido à alta pressão (5 MPa) e à alta temperatura (geralmente 100 °C) sob as quais, o produto é submetido. A oxidação da amostra é registrada graficamente fornecendo o Período de Indução (momento de queda acentuada da pressão, que marca o tempo a partir do qual a oxidação da amostra se acelera) permitindo também que seja estimada a vida útil do produto.

De acordo com a Tabela 10, foi possível observar que as amostras de *Minced* que sofreram adição de extratos de algas, apresentaram um aumento significativo no período de indução, em relação à amostra sem antioxidante.

Com relação ao efeito da concentração dos extratos, foi possível observar que, diferentemente do ocorrido no método do Rancimat, a alga Nori, 100 µg/mL, apresentou efeito antioxidante menor que 25 e 50 µg/mL (Tabela 10). Este fato sugere que, para este método, pode existir uma tendência de ação pró-oxidante com o aumento da concentração do extrato. Essa mesma tendência foi encontrada para a alga Hijiki. Apesar da tendência, as concentrações testadas, neste experimento, apresentaram efeito antioxidante, já que o fator de proteção foi maior que 1 (Tabela 10).

O *Minced* adicionado de BHT, 100 µg/mL, apresentou maior extensão de vida útil, de 135%, em relação ao *Minced* sem antioxidante, seguida pela alga Nori, 50 µg/mL, de 48%.

Tabela 10- Período de indução (PI), fator de proteção (FP) e extensão de vida útil (EV) das amostras de *Minced* analisadas no Oxipres

Tratamentos	PI (horas)	FP	EV (%)
Sem antioxidante	4,6 ± 0,21 <sup>d</sup>	-	
BHT: 100 µg/mL	10,8 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,35	135
Nori: 25 µg/mL	6,6 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,43	43
Nori: 50 µg/mL	6,8 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,48	48
Nori: 100 µg/mL	5,7 ± 0,13 <sup>c</sup>	1,24	24
Hijiki: 25 µg/mL	5,8 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,26	26
Hijiki: 50 µg/mL	5,4 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,17	17
Hijiki: 100 µg/mL	5,3 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,15	15

Médias (n=2) e desvio padrão estão indicados. Letras diferentes indicadas nas colunas diferem estatisticamente em nível de 5% (Teste de Tukey)

Não foram encontrados artigos, na literatura, que tenham analisado o período de indução de extratos de algas marinhas aplicados em produtos, pelo método do Oxipres. De acordo com Trojakova (2001), o extrato etanólico de alecrim, quando aplicado em óleo de girassol, apresentou fator de proteção, pelo método do Oxipres, de 0,3; neste caso, o fator de proteção do BHT foi 0,56.

Os testes acelerados permitem estimar, de forma rápida, a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa ou a eficácia “teórica” de um antioxidante isolado ou em associação. Uma vez que os fenômenos naturais de oxidação são processos lentos, desenrolando-se frequentemente ao longo de vários meses, os testes de estabilidade, em tempo real, tornam-se por vezes incompatíveis com o controle de qualidade em nível industrial (FRANKEL et al., 1993). Deste modo, os testes de estabilidade acelerados assumem particular importância na rotina analítica. Porém, de acordo com Silva; Borges; Ferreira (1999), os testes acelerados não fornecem garantias quanto à validade da sua extrapolação para as condições normais de conservação e uso dos produtos, ou de proteção por parte dos antioxidantes.

### 5.9 Rendimento da extração de CMS e *Minced*

O rendimento, em “polpa”, do pescado, pode ser influenciado por diversos fatores, tais como a espécie, o tamanho do peixe e o método utilizado para a sua obtenção. No caso do *Minced*, podem influenciar, no rendimento final, a regulagem da despoldadora, o número de lavagens empregadas e o método utilizado para drenar o excesso de água. Os rendimentos em CMS e *Minced* estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Rendimento da CMS e do *Minced* de tilápia

Peixe inteiro (1)	Peixe limpo* (2)	CMS (3)	<i>Minced</i> (4)	Rendimento (%)			
				(3)/(1)	(3)/(2)	(4)/(3)	(4)/(2)
74,30 Kg	32,42 Kg	25,95 Kg	21,11 Kg	34,92	80,04	81,34	65,11

\*Peixe limpo refere-se ao peixe descamado, descabeçado, eviscerado e sem pele

O rendimento em CMS para a tilápia, que foi de 34,92% em relação ao peixe inteiro, apresentou valor semelhante ao encontrado por Gryscek, Oetterer e Gallo (2003), 33,57% e Angelini (2010), 33,76%; porém inferior ao encontrado por Kirschnik e Macedo-Viegas (2009), que alcançou 46,90%.

O rendimento em CMS, em relação ao peixe eviscerado e descabeçado, que foi de 80,04%, apresentou valor superior ao encontrado por Gryscek, Oetterer e Gallo (2003), 51,73%; semelhante ao encontrado por Kirschnik e Macedo-Viegas (2009), 78,60%; e considerado menor ao encontrado por Angelini (2010), 87,43%.

O rendimento, após o processo de lavagem, do *Mincéd* em relação à CMS, que foi de 81,34%, mostrou valor semelhante aos relatados por Kirschnik e Macedo-Viegas (2009), 84,7% e Angelini (2010), 82,10%, porém maior que o encontrado por Mello et al. (2010), que foi de 59,68%. Quanto ao rendimento em *Mincéd*, em relação ao peixe limpo, que foi de 65,11%, apresentou-se inferior aos valores obtidos por Kirschnik e Macedo-Viegas (2009), 78,60%; Minozzo, Waszczyński e Boscolo (2008), 72,06% e Angelini (2010), 71,79%.

As diferenças de rendimento podem ter ocorrido devido a duas causas principais. Uma delas é a diferença na regulagem da despoldadora. No momento da montagem do equipamento, pode ocorrer uma grande variação no ajuste do conjunto de lâminas, responsáveis pela separação mecânica da carne, o que diminui ou aumenta o rendimento em CMS, com relação ao peixe descabeçado e eviscerado. A segunda causa pode estar na diferença no peso inicial da tilápia. Peixes com maior peso e, conseqüentemente, teor de gordura mais elevado, tem o seu rendimento em *Mincéd*, diminuído em relação à CMS, quando comparado ao peixe magro. Isto se deve ao fato do processo de lavagem, ao atuar na remoção das proteínas sarcoplasmáticas, remover, prioritariamente, as gorduras (MELLO et al., 2010).

## **5.10 Estudo de vida útil**

### **5.10.1 Cor instrumental do *Mincéd***

As médias de L\* (luminosidade) para a variável tratamento não apresentaram diferença significativa ( $p=0,1618$ ). Portanto, a adição de extratos de algas não influenciou na luminosidade das amostras de *Mincéd* de tilápia (Tabela 12). Com relação ao tempo de armazenamento ( $p<0,0001$ ) e a interação tratamento x tempo ( $p=0,0233$ ) foram observadas diferenças significativas. Ao longo do tempo de armazenamento houve uma queda na luminosidade das amostras, variando de 77,62 (início) para 71,09 (180 dias).

Tabela 12- Valores médios de L\* para o *Minced*, durante os 180 dias de armazenamento congelado

Tratamentos	L* - Dias de armazenamento			
	0	60	120	180
Sem antioxidante	78,43	70,85	66,64	71,85
BHT: 100 µg/mL	80,35	71,71	70,22	71,59
Nori: 25 µg/mL	78,75	71,87	72,03	72,05
Nori: 50 µg/mL	76,07	70,56	71,11	71,30
Hijiki: 25 µg/mL	76,98	67,38	69,20	71,07
Hijiki: 50 µg/mL	75,09	68,66	69,33	68,71
p<0,0001	77,62 <sup>A</sup>	70,35 <sup>B</sup>	69,76 <sup>B</sup>	71,09 <sup>B</sup>

Erro padrão para tempo de armazenamento: 0,45; para tempo x tratamento: 1,12 Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os valores médios de a\* (intensidade de vermelho/verde), tanto a variável tratamento (p=0,0079) como a variável tempo (p=0,0131) apresentaram diferença significativa. Pode ser observado, na Tabela 13, que o *Minced* adicionado da alga Nori possuiu o menor valor de a\*. Para a alga Hijiki, este parâmetro foi considerado o mais alto. Porém, ao se analisar os resultados para o *Minced* sem antioxidante e com adição de BHT, observou-se que, o *Minced* com adição de Nori é semelhante ao adicionado de Hijiki. Este fato revela que a diferença na intensidade de vermelho/verde ocorreu somente em função das algas, e não esteve relacionada aos controles. Para o tempo de armazenamento, os resultados revelaram uma queda de a\* aos 120 dias. Para a interação tratamento x tempo (p=0,1392), os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 13- Valores médios de  $a^*$  para o de *Minced*, durante os 180 dias de armazenamento congelado

Tratamentos	$a^*$ - Dias de armazenamento				p = 0,0079
	0	60	120	180	
Sem antioxidante	2,08	2,16	1,82	1,51	1,89 <sup>ab</sup>
BHT: 100 µg/mL	2,39	2,37	2,56	1,95	2,32 <sup>ab</sup>
Nori: 25 µg/mL	1,45	1,52	1,55	1,59	1,43 <sup>b</sup>
Nori: 50 µg/mL	1,43	1,57	1,12	1,66	1,45 <sup>b</sup>
Hijiki: 25 µg/mL	2,44	3,11	1,77	2,27	2,40 <sup>a</sup>
Hijiki: 50 µg/mL	3,31	2,63	2,40	2,21	2,64 <sup>a</sup>
p=0,0131	2,18 <sup>AB</sup>	2,23 <sup>A</sup>	1,81 <sup>B</sup>	1,87 <sup>AB</sup>	

Erro padrão para tratamento- 0,16; para tempo – 0,11. Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os valores médios de  $b^*$  (intensidade de amarelo/azul), tanto a variável tratamento (p=0,0002) como a variável tempo (p=0,0057) apresentaram diferença significativa (Tabela 14). Foi possível observar que os maiores valores de  $b^*$  foram encontrados para os tratamentos com as maiores concentrações de algas, ou seja, Nori 50 µg/mL e Hijiki 50 µg/mL. Além disso, os menores valores foram descritos para os controles, a saber, *Minced* sem antioxidante e com BHT. Para o tempo de armazenamento, os resultados também revelaram uma queda de  $b^*$  no tempo 120 dias. Para a interação tratamento x tempo (p=0,7097), os resultados também não apresentaram diferença estatisticamente significativa, seguindo o mesmo resultado do parâmetro  $a^*$ .

Tabela 14- Valores médios de  $b^*$  para o *Mincéd*, durante os 180 dias de armazenamento congelado

Tratamentos	$b^*$ - Dias de armazenamento				p = 0,0002
	0	60	120	180	
Sem antioxidante	6,95	5,38	4,14	5,88	5,59 <sup>c</sup>
BHT: 100 µg/mL	7,72	6,38	5,81	5,80	6,43 <sup>c</sup>
Nori: 25 µg/mL	11,67	10,26	9,04	11,25	10,55 <sup>b</sup>
Nori: 50 µg/mL	15,39	12,69	12,93	14,87	13,97 <sup>ab</sup>
Hijiki: 25 µg/mL	13,14	14,42	9,85	12,87	12,57 <sup>b</sup>
Hijiki: 50 µg/mL	17,75	16,18	16,60	17,20	16,97 <sup>a</sup>
p=0,0057	12,10 <sup>A</sup>	10,89 <sup>AB</sup>	9,74 <sup>B</sup>	11,32 <sup>AB</sup>	

Erro padrão para tratamento: 0,71; para tempo: 0,46. Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos que analisassem a cor instrumental em *Mincéd* com aplicação de extratos de algas marinhas. Oliveira Filho et al. (2010) utilizaram diferentes proporções de *Mincéd* de tilápia na formulação de salsichas, armazenadas durante 40 dias, sob refrigeração ( $0 \pm 0,3$  °C). Ao analisarem a cor instrumental, os autores verificaram que não houve diferença significativa nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , quanto ao tempo de armazenamento. Com relação às diferentes formulações, os autores observaram uma queda no valor absoluto dos três parâmetros, à medida que se aumentou a proporção de *Mincéd* na formulação da salsicha.

### 5.10.2 Composição química do *Mincéd*

Os valores referentes à composição centesimal dos 6 tratamentos do *Mincéd* estão expostos na Tabela 15. Para a variável Tratamento, não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de umidade (p = 0,2026), proteína (p= 0,3585), lipídeos (p= 0,4183) e cinza (p=0,7175) ou seja, a aplicação dos extratos de algas e do antioxidante sintético BHT não influenciaram na composição química do *Mincéd* inicialmente obtido no experimento. Para a interação Tratamento

x Tempo de Armazenamento também não houve diferença estatística significativa (umidade,  $p= 0,4314$ ; proteína,  $p= 0,0507$ ; lipídeos,  $p= 0,9523$  e cinza,  $p=0,4325$ ).

Tabela 15- Composição centesimal do *Minced* de tilápia

Tratamentos	Composição Centesimal (g/100g)			
	Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinza
Sem antioxidante	82,03	12,08	5,12	0,44
BHT: 100 µg/MI	81,03	12,38	5,79	0,45
Nori: 25 µg/mL	81,41	11,54	5,60	0,47
Nori: 50 µg/mL	80,04	13,16	6,00	0,48
Hijiki: 25 µg/mL	80,93	12,69	5,72	0,45
Hijiki: 50 µg/mL	80,80	12,60	5,71	0,46

Erro padrão para Umidade: 0,732; para Protéina: 0,649; para Lipídeos 0,372; para Cinza – 0,026. Valores médios (n=3) obtidos em base úmida.

Com relação ao tempo de armazenamento, para os teores de umidade e cinza, não houve diferença significativa ( $p= 0,3353$  e  $p= 0,3040$ , respectivamente). Para proteína e lipídeos, os valores variaram com o tempo (Tabela 16).

Tabela 16- Teores de proteína e lipídeos do *Minced*, durante o tempo de armazenamento

Tempo (dias)	Proteína	Lipídeos
0	12,43 <sup>ab</sup>	5,49 <sup>b</sup>
60	12,73 <sup>a</sup>	5,59 <sup>ab</sup>
120	11,74 <sup>b</sup>	6,04 <sup>a</sup>
180	12,74 <sup>a</sup>	5,54 <sup>b</sup>

Erro padrão para Proteína: 0,265; Erro padrão para Lipídeos: 0,152. Médias (n=3) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todos os parâmetros analisados na composição centesimal dos vários *Minceds* podem diferir, pois estes são diretamente influenciados quanto ao número

de lavagens e ao processo de retirada de água (KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

Os valores de umidade deste estudo, em média 81%, estão próximos aos observados por Kirschnik e Macedo-Viegas (2009), 88,78% e Mello et al. (2010), 80,69%, para *Minced* de tilápia. Marengoni et al. (2009) encontraram 76,30% e, Mélo et al. (2011), 72,75% de umidade para CMS de tilápia.

Para o teor de proteína, nesta pesquisa, foi encontrado, em média, o valor de 12,4%. Outros trabalhos relataram os valores de 8,93% (KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009), 17,74% (MARENGONI et al., 2009), 16,5% (MELLO et al., 2010) e 14,29% (MÉLO et al., 2011).

Com relação aos lipídeos, os valores variaram mais amplamente. Neste estudo, foram encontrados, em média, 5,66%. Os valores obtidos por outros autores foram: 1,63% (KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009), 3,86% (MARENGONI et al., 2009), 3,14% (MELLO et al., 2010) e 9,26% (MÉLO et al., 2011).

Para o teor de cinza, a variação não é tão expressiva quanto à ocorrida para os outros parâmetros. Os valores encontrados foram: 0,46% (KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009), 0,88% (MARENGONI et al., 2009), 0,50% (MELLO et al., 2010) e 0,45% (MÉLO et al., 2011). Nesta pesquisa foi encontrada a média de 0,46%.

Os teores de ácidos graxos saturados totais, nos tratamentos de *minced* de tilápia variaram de 2,5 a 3,02 g/100g. Os monoinsaturados totais variaram de 1,79 a 2,51 g/100g. Para os poliinsaturados, os valores ficaram entre 0,32 e 0,85, como apresentado na Tabela 17. Observou-se que, o menor valor para o total de ácidos graxos monoinsaturados ocorreu no *Minced* sem antioxidante; este fato sugere uma possível degradação destes ácidos graxos. Os tratamentos de *Minced* com adição de extratos de algas apresentaram teores mais elevados de ácidos graxos monoinsaturados, como para o *Minced* adicionado do extrato da alga Nori, a 50 µg/mL, cujo teor de monoinsaturados apresentou-se próximo ao encontrado para o *Minced* com BHT.

Tabela 17- Ácidos graxos em *Minced* de tilápia (g/100g)

Ácidos Graxos	Tratamentos * (g/100g)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Ácido Butírico (C4)	0,28	0,21	0,30	0,00	0,00	0,00
Láurico (C12)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
Ácido Mirístico (C14:0)	0,21	0,24	0,18	0,28	0,29	0,27
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
Ácido Palmítico (C16:0)	1,49	1,73	1,54	2,04	2,10	2,02
Ácido Heptadecanóico (C17:0)	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Ácido Esteárico (C18:0)	0,51	0,46	0,69	0,57	0,57	0,52
Ácido Araquídico (C20:0)	0,00	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
Tricosanóico (C23:0)	0,00	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00
Total: Gorduras Saturadas	2,50	2,72	2,77	2,96	3,02	2,87
Ácido Miristoleico (C14:1)	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,26	0,35	0,25	0,37	0,35	0,34
Ácido Oléico (C18:1n9c)	1,46	2,02	1,53	2,09	1,97	1,93
Ácido cis-Eicosanóico (C20:1)	0,07	0,11	0,08	0,00	0,00	0,00
Ácido Erucico (C22:1n9)	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00
Total: Gorduras Monoinsaturadas	1,79	2,51	1,88	2,47	2,34	2,28
Ácido Linoléico (C18:2n6c)	0,47	0,77	0,53	0,20	0,18	0,19
Ácido Linolênico (C18:3n3)	0,02	0,05	0,03	0,16	0,14	0,14
Ácido Cis-Eicosadienóico (C20:2)	0,00	0,03	0,03	0,01	0,00	0,00
Total: Gorduras Polinsaturadas	0,49	0,85	0,59	0,37	0,32	0,33
Gorduras Trans	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

\* T1: *Minced* sem antioxidante; T2: *Minced* com BHT, 100 µg/mL; T3: *Minced* com Nori, 25 µg/mL; T4: *Minced* com Nori, 50 µg/mL; T5: *Minced* com Hijiki, 25 µg/mL; T6: *Minced* com Hijiki, 50 µg/mL.

Na fração dos ácidos graxos saturados, o ácido palmítico foi o predominante, seguido pelo esteárico, variando entre 1,49 a 2,10 g/100g e 0,46 a 0,69 g/100g, respectivamente. Quanto à fração dos monoinsaturados, o ácido graxo oléico se destacou, variando entre 1,46 a 2,09 g/100g. Para os poliinsaturados, o ácido graxo linoléico foi o mais abundante, avaliado entre 0,18 a 0,77 g/100g. Valores semelhantes foram encontrados por Angelini (2010) em *Quenelle* de tilápia. Não foram detectados os ácidos docosapentaenóico (DPA) e docosahexadienóico (DHA), confirmando o que seria esperado para produtos de tilápia, com baixos teores ou até mesmo ausentes, em pesquisas feitas por Ferraz de Arruda (2004).

### 5.10.3 Frescor do *Minced*

#### 5.10.3.1 pH

O pescado apresenta pH próximo da neutralidade, o que propicia o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patógenos (OGAWA; MAIA, 1999). De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952), o pH do pescado não deve ultrapassar 6,8 e não ser inferior a 6,5, limites estabelecidos para o pescado fresco. Não existem limites estabelecidos, descritos na literatura ou em legislação, para *Minced* e derivados. De acordo com Lee (1986), se o pH for mantido entre a faixa de 6,5 e 7, possibilitará uma elevada capacidade de retenção de água. O aumento do pH pode ter como causas o tipo e a carga microbiana, os métodos de captura, manuseio e armazenamento do pescado (SOARES et al., 1998).

Os valores médios de pH apresentados pelo *Minced* nos diferentes tratamentos encontraram-se um pouco acima dos limites preconizados pela legislação para peixe “fresco” (Tabela 18). Outros pesquisadores encontraram valores semelhantes. Jesus, Lessi e Tenuta-Filho (2001) encontraram valores entre 6,5 e 7,07 em CMS de peixes amazônicos estocados por 150 dias, sob congelamento. Kirschnik e Macedo-Viegas (2009) também encontraram o valor de pH de 7,2 para *Minced* de tilápia adicionado de eritorbato de sódio e tripolifosfato de sódio. Os autores explicaram que os polifosfatos têm efeito crioprotetor, mantendo o pH da carne próximo da neutralidade. Neiva (2008) e Angelini (2010) encontraram para *Minced* de tilápia os valores de 6,89 e 6,78, respectivamente.

Não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,0926$ ) entre os valores médios de pH dos 6 tratamentos, ou seja, a aplicação dos extratos de algas e do antioxidante sintético BHT, não alteraram o valor de pH do *Minced* inicialmente obtido no experimento. Para a interação Tratamento x Tempo também não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,8596$ ). Com relação ao tempo de armazenamento, observou-se diferença significativa ( $p < 0,0001$ ), havendo pequena diminuição do pH no decorrer do tempo.

Tabela 18- Valores de pH para as amostras de *Minced* de tilápia

Tratamentos	Dias de armazenamento			
	0	60	120	180
Sem antioxidante	7,1	7,1	6,95	6,90
BHT: 100 µg/mL	7,09	7,10	6,99	6,85
Nori: 25 µg/mL	7,08	7,09	6,96	6,88
Nori: 50 µg/mL	7,03	7,07	6,96	6,86
Hijiki: 25 µg/mL	7,05	7,07	6,91	6,87
Hijiki: 50 µg/mL	7,05	7,04	6,91	6,82
$p < 0,0001$	7,06 <sup>A</sup>	7,07 <sup>A</sup>	6,95 <sup>B</sup>	6,86 <sup>C</sup>

Erro padrão para tempo de armazenamento: 0,01. Médias ( $n=3$ ) seguidas por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O comportamento do pH durante o armazenamento, sob congelamento, é dependente da temperatura de estocagem, composição em sais, estado fisiológico, poder tampão das proteínas e ação enzimática (GRYSCHER; OETTERER; GALLO, 2003; KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009). A diminuição do pH pode ser explicada pela presença de ácidos, como clorogênico, vanílico, cafeico, cinâmico, propanóico e acético, detectados pelas técnicas cromatográficas, nos extratos das algas.

Segundo Ogawa e Maia (1999) o pH é um índice que por si só, não deve ser adotado para avaliar o estado de frescor ou início de deterioração em pescado. Este índice é muito variável entre as diferentes amostras e apresenta ciclos de flutuação durante a estocagem refrigerada e congelada. Apesar disso, vários autores têm utilizado esta metodologia por ser de fácil e rápida execução (MARTIN; GRAY; PIERSON, 1978).

### 5.10.3.2 Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT)

A avaliação das bases nitrogenadas voláteis totais (BNVT) é um método relativamente simples e comumente usado para avaliar o frescor de pescado. No Brasil, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece o valor de 30 mg de N/100 g como limite máximo de BNVT para pescado fresco, exceto para elasmobrânquios (BRASIL, 1997). De acordo com Ogawa e Maia (1999), para peixes em excelente estado de frescor, o teor de BNVT atinge 5 a 10 mg de N/100 g de músculo; peixes com frescor satisfatório podem atingir até 15 a 25 mg de N/100 g. Antes de ocorrerem as alterações no pescado, os teores podem variar de 30 a 40 mg de N/100g. Para o pescado deteriorado, o teor deverá estar acima de 50 mg de N/100g.

De acordo com a Tabela 19, foi possível observar que, para todas as variáveis, tratamento ( $p = 0,0248$ ), tempo de armazenamento ( $p < 0,0001$ ) e a interação tratamento x tempo ( $p < 0,0001$ ), houve diferença significativa nos resultados de BNVT.

Para a variável tratamento, o maior teor de BNVT ocorreu no *Minced* sem antioxidante. Além disso, foi possível observar que os menores teores foram encontrados para os tratamentos com as maiores concentrações de algas (Nori 50  $\mu\text{g/mL}$  e Hijiki 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Este fato demonstra a capacidade dos extratos de algas marinhas em exercer efeito protetor para o *Minced*. Com relação ao tempo, observou-se um aumento nos teores de BNVT aos 120 e 180 dias de armazenamento.

Tabela 19- Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (mg N/100g) para o *Minced*, durante os 180 dias de armazenamento

Tratamentos	Dias de armazenamento				p = 0,0248
	0	60	120	180	
Sem antioxidante	4,14	3,72	4,62	6,55	6,40 <sup>a</sup>
BHT: 100 µg/mL	2,50	3,34	7,75	6,03	4,91 <sup>ab</sup>
Nori: 25 µg/mL	3,70	3,34	4,31	6,81	4,54 <sup>ab</sup>
Nori: 50 µg/mL	1,55	3,04	5,17	6,12	3,97 <sup>b</sup>
Hijiki: 25 µg/mL	2,84	2,83	7,75	6,55	4,99 <sup>ab</sup>
Hijiki: 50 µg/mL	3,79	2,14	5,17	6,89	4,50 <sup>b</sup>
p<0,0001	3,08 <sup>B</sup>	3,07 <sup>B</sup>	6,89 <sup>A</sup>	6,49 <sup>A</sup>	

Erro padrão para tratamento: 0,34; para tempo: 0,22; para tratamento x tempo: 0,53. Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todas as amostras, durante o tempo de armazenamento, apresentaram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1997). E, de acordo com Ogawa e Maia (1999), as amostras, apresentaram-se em excelente estado de frescor, ou seja, com teores entre 5 e 10 mg N/100g de músculo.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos que analisassem o teor de bases nitrogenadas voláteis totais em *Minced* com aplicação de extratos de algas marinhas. Oliveira Filho et al. (2010) utilizaram diferentes proporções de *Minced* de tilápia na formulação de salsichas, armazenadas durante 40 dias sob refrigeração ( $0 \pm 0,3$  °C). Ao analisarem o teor de BNVT, os autores verificaram que não houve diferença significativa quanto ao tempo de armazenamento.

A produção de BNVT, durante a estocagem do pescado, é resultado da ação de enzimas tissulares e da atividade microbiana, sendo composta, principalmente, por amônia, trimetilamina e dimetilamina (CONTRERAS-GUZMÁN, 2002).

### 5.10.3.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os lipídeos estão sujeitos a uma série de reações que podem levar a modificações de suas estruturas, afetando o valor nutricional e também os padrões de qualidade do alimento. Sendo assim, a oxidação lipídica é umas das principais reações deteriorativas que ocorrem durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo final dos alimentos (SOARES, 2002).

Para carnes, pescado e derivados, a resposta do teste de TBARS é relevante, uma vez que os processos envolvidos na elaboração de produtos cárneos e que incluam moagem, mistura e cozimento, favorecem a formação do malonaldeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos, formado durante o processo oxidativo, sendo fundamental o emprego do teste, em questão, na avaliação da qualidade do produto final. Especificamente para pescado e derivados, o teste é um dos mais adequados na predição da rancidez, pela simplicidade e rapidez (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

Os resultados apresentados na Tabela 20 demonstram que, os extratos de algas marinhas apresentaram efeito pró-oxidante no *Minced* de tilápia. Este fato pode ser constatado ao se comparar os resultados obtidos com as algas Nori e Hijiki, nas duas concentrações testadas e os resultados do *Minced*, sem antioxidante. No dia do processamento, este efeito pró-oxidante ainda não pode ser notado, sendo Nori e Hijiki a 25 µg/mL consideradas antioxidantes frente ao controle. Porém, dos 60 dias em diante, estas algas apresentaram valores de TBARS superiores ao apresentado pelo *Minced* sem antioxidante, evidenciando o efeito contrário ao obtido nos testes *in vitro* e de oxidação acelerada. O pico de oxidação foi encontrado aos 120 dias de armazenamento congelado, com queda aos 180 dias. Este comportamento também foi encontrado por Angelini (2010), com pico em 30 dias de armazenamento congelado para Quenelle de tilápia, com quedas sucessivas até 120 dias. De acordo com Angelini (2010), a queda se deveu provavelmente à síntese de produtos da oxidação que passaram a não ser detectados por esta metodologia. Para Ninan et al. (2008) esta redução pode ser explicada pela provável interação do malonaldeído com a proteína presente no sistema.

Tabela 20- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico para *Minced*, durante 180 dias de armazenamento

Tratamentos	Dias de armazenamento				p<0,0001
	0	60	120	180	
Sem antioxidante	0,45 <sup>bc</sup>	0,18 <sup>ghi</sup>	0,26 <sup>efghi</sup>	0,24 <sup>efghi</sup>	0,28 <sup>d</sup>
BHT: 100 µg/mL	0,15 <sup>hi</sup>	0,11 <sup>i</sup>	0,22 <sup>fg</sup>	0,11 <sup>i</sup>	0,15 <sup>e</sup>
Nori: 25 µg/mL	0,34 <sup>cdef</sup>	0,22 <sup>fg</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,27 <sup>defgh</sup>	0,33 <sup>cd</sup>
Nori: 50 µg/mL	0,45 <sup>bc</sup>	0,19 <sup>fg</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,32 <sup>cdefg</sup>	0,37 <sup>bc</sup>
Hijiki: 25 µg/mL	0,29 <sup>defgh</sup>	0,33 <sup>cdefg</sup>	0,77 <sup>a</sup>	0,25 <sup>efghi</sup>	0,41 <sup>ab</sup>
Hijiki: 50 µg/mL	0,41 <sup>bcd</sup>	0,29 <sup>defgh</sup>	0,72 <sup>a</sup>	0,38 <sup>bcde</sup>	0,45 <sup>a</sup>
p<0,0001	0,35 <sup>B</sup>	0,22 <sup>C</sup>	0,49 <sup>A</sup>	0,26 <sup>C</sup>	

Erro padrão para tratamento: 0,013; para tempo: 0,01; para tratamento x tempo: 0,025. Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas, minúsculas e minúsculas em itálico distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao TBARS, Gryscek; Oetterer; Gallo (2003) encontraram 0,14 mg de malonaldeído/Kg e Kirschnik e Macedo-Viegas (2009) encontraram 0,16 mg. Estes valores são semelhantes aos teores encontrados neste trabalho para o *Minced* com BHT, porém inferiores aos valores encontrados para os tratamentos com algas marinhas. Neiva (2008) observou o valor de 5,74 mg de malonaldeído/Kg, superior ao encontrado nesta pesquisa e pelos outros autores. Segundo a autora, este resultado foi atribuído a uma possível exposição da matéria-prima ao oxigênio, durante a manipulação, além desta ser constituída por várias espécies marinhas subutilizadas, em estado de frescor provavelmente no seu limite para aproveitamento.

O efeito pró-oxidante de produtos naturais e compostos isolados, principalmente os fenólicos, foi observado anteriormente em diversos estudos. O potencial do ácido ascórbico para agir como um pró-oxidante foi documentado por Laudicina e Marnett (1990). De acordo com Duarte-Almeida et al. (2006) a atividade pró-oxidante da acerola no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico está diretamente ligada ao alto teor de vitamina C deste fruto. Yen, Chen e Peng (1997) encontraram o mesmo efeito para extratos de chás, em baixas concentrações, em sistemas *in vivo*.

O propil-galato (PG) é um éster do 3,4,5 ácido triidroxibenzóico; tem uma concentração ótima de atividade como antioxidante e quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidante. O  $\alpha$ -tocoferol também pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante, dependendo do sistema testado, da concentração, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006). Jung e Min (1990) definiram concentrações ótimas, de 100 mg/kg para  $\alpha$ , 250 mg/kg para  $\gamma$  e 500 mg/kg para  $\delta$ - tocoferóis, para aumentar a estabilidade oxidativa de óleos de soja purificados e armazenados ao abrigo da luz, à temperatura de 55 °C. Os tocoferóis apresentaram significantes efeitos pró-oxidantes em concentrações acima destes níveis.

A atividade antioxidante (AA) ou pró-oxidante (PO) de fenólicos é dependente dos seguintes fatores: potencial de redução de metais, poder de quelação e pH. Pesquisas evidenciaram que as propriedades antioxidantes dos fenólicos são também dependentes das suas características de solubilidade (MOREIRA; MANCINI FILHO, 2003).

A quercetina está presente em frutas e em vegetais, e é o flavonóide mais abundante encontrado no vinho tinto. Entretanto, esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (GASPAR et al., 1993).

De acordo com Guerra e Lajolo (2005), quando se adiciona um antioxidante a um lipídio, o aumento no tempo de indução ocorre até uma concentração crítica do mesmo, a partir da qual a ação pode ser pró-oxidante.

O efeito antioxidante do óleo essencial de casca d'anta (*Drimys brasiliensis* Miers) foi avaliado, pelo método de TBARS, em CMS de aves, durante 4 dias de armazenamento refrigerado. Os autores concluíram que a adição do óleo essencial promoveu um expressivo aumento da oxidação lipídica, não sendo, portanto, conveniente a sua aplicação em produtos cárneos gordurosos devido aos efeitos deletérios oriundos de seu comportamento como pró-oxidante (DUTRA et al., 2011).

A legislação vigente no Brasil não apresenta limite máximo para malonaldeído/kg em produtos cárneos e produtos derivados de pescado, entretanto, o produto cárneo pode ser considerado em bom estado, se apresentar valores abaixo de 3 mg de malonaldeído/kg de amostra (AL-KAHTANI; ABU-TARBOUSH; BAJABER, 1996). Sendo, assim, apesar do efeito pró-oxidante apresentado pelas algas, as amostras de *Minced* de tilápia ainda permaneceram em estado satisfatório aos 180 dias de armazenamento congelado.

#### 5.10.4 Análise microbiológica do *Minced*

Durante os 180 dias de armazenamento congelado, não foi detectada a presença de *Salmonella sp.*, nas amostras de *Minced* de tilápia. Também não foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, após os testes confirmativos. Respeitando-se os limites de detecção do método utilizado, tem-se < 10 UFC de *Staphylococcus coagulase* positiva/g de *Minced*. Angelini (2010), Kirschnik e Macedo-Viegas (2009) e Minozzo, Waszczyński e Boscolo (2008) encontraram resultados semelhantes para Quenelle, CMS e patê de tilápia, respectivamente. Mélo et al. (2011) também não detectaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em CMS e mortadela, obtidas a partir de tilápia do Nilo. Mello et al. (2010) encontraram *Salmonella sp.* em um dos lotes de *Minced* e em *Surimi* de tilápia, além de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Os resultados das análises de coliformes estão apresentados na Tabela 21. Para coliformes a 45 °C, que são os microrganismos preconizados pela legislação, as amostras de *Minced* não apresentaram contagem, durante os 180 dias de armazenamento congelado.

Angelini (2010) encontrou aos 120 de armazenamento, o valor de <3,0 NMP/g. Kirschnik e Macedo-Viegas (2009) detectaram ausência de coliformes fecais. Minozzo, Waszczyński e Boscolo (2008) encontraram para patês cremoso e pastoso de tilápia os valores de 23 e 15 NMP/g, respectivamente. Mello et al. (2010) observaram ausência de *E. coli* para “polpa” e *Surimi* de tilápia.

Tabela 21- Coliformes totais e Coliformes a 45°C (NMP/g) em *Minced* de tilápia, durante 180 dias de armazenamento congelado

T* dias	Coliformes Totais (NMP/g)				Coliformes a 45 °C (NMP/g)			
	0	60	120	180	0	60	120	180
T1	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
T2	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
T3	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
T4	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
T5	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
T6	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0

\*Tratamentos: T1: *Minced* sem antioxidante; T2: *Minced* com BHT, 100 µg/mL; T3: *Minced* com Nori, 25 µg/mL; T4: *Minced* com Nori, 50 µg/mL; T5: *Minced* com Hijiki, 25 µg/mL; T6: *Minced* com Hijiki, 50 µg/mL.

Os tratamentos apresentaram-se dentro dos parâmetros tolerados pelo regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos, descrito na RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece para produtos a base de pescado, refrigerados e congelados, como limite máximo para *Staphylococcus* coagulase positiva,  $5 \times 10^3$  UFC/g, coliformes a 45 °C,  $10^3$  NMP/g e ausência de *Salmonella sp* em 25 g de amostra.

Embora a legislação brasileira não estabeleça limites para microrganismos mesófilos e psicrófilos, populações elevadas podem reduzir a vida útil do pescado (KIRSCHINK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

De acordo com a Tabela 22, foi possível observar que, tanto a contagem total em placa de mesófilos quanto de psicrófilos, em *Minced* de tilápia, não ultrapassaram a contagem de  $10^3$  UFC/g. Além disso, a contagem de ambos diminuiu durante o armazenamento congelado. Marengoni et al. (2009) encontraram  $2,26 \times 10^4$  UFC/g de mesófilos para CMS de tilápia. Mélo et al. (2011) encontraram, para mesófilos, a contagem de  $4,3 \times 10^2$  UFC/g em CMS lavada e  $6,6 \times 10^5$  em CMS não lavada de tilápia.

Tabela 22- Contagem total em placa de mesófilos e psicotróficos do *Minced*, durante os 180 dias de armazenamento congelado

T* dias	Mesófilos (UFC/g)				Psicotróficos (UFC/g)			
	0	60	120	180	0	60	120	180
T1	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	< 10	$1,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	$9,2 \times 10^1$ est
T2	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$6,7 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$
T3	$1,1 \times 10^3$	$3,9 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	$8 \times 10^1$ est	$1,5 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$
T4	$3,7 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$8 \times 10^1$ est	$3,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	$9 \times 10^1$ est
T5	$1,5 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$	$6,5 \times 10^1$ est
T6	$4,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	$4,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	< 10	< 10

\*Tratamentos: T1: *Minced* sem antioxidante; T2: *Minced* com BHT, 100 µg/mL; T3: *Minced* com Nori, 25 µg/mL; T4: *Minced* com Nori, 50 µg/mL; T5: *Minced* com Hijiki, 25 µg/mL; T6: *Minced* com Hijiki, 50 µg/mL. (est: contagem estimada)

A *International Commission on Microbiological Specification for Foods* – ICMSF estabelece o limite de  $10^7$  UFC/g para contagem padrão em placas de microrganismos aeróbicos (ICMSF, 1998). Sendo assim, os valores encontrados para as amostras de todos os tratamentos ficaram dentro do limite citado na literatura.

Os resultados satisfatórios na avaliação microbiológica podem ser advindos do cuidado nas operações de limpeza e sanificação dos utensílios e equipamentos, da higiene dos manipuladores, além da utilização de água clorada ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) no processamento. Kirschnik e Macedo-Viegas (2009) observaram menor contagem de psicrotóxicos na CMS que foi submetida à lavagem, sugerindo que o processo de lavagem pode exercer efeito benéfico de redução da carga microbiana. Tal efeito também foi constatado por Gryscek, Oetterer e Gallo (2003).

#### **5.10.5 Análise sensorial do *Mincéd***

Na avaliação sensorial, a degustação das amostras ao longo do tempo permite detectar o aparecimento progressivo dos produtos de degradação dos lipídeos, podendo, portanto, ser considerada a mais fidedigna de todas as determinações. No entanto, esta análise não pode se constituir, por si só, um método de controle; difícil de ser posta em prática e de custos elevados, a análise sensorial apresenta alguns inconvenientes. A sensação percebida não é única e modifica-se à medida que a oxidação progride. Se por um lado os diferentes constituintes de um produto influenciam a percepção, por outro a sensibilidade difere de indivíduo para indivíduo (SILVA et al., 1999).

Os resultados da análise sensorial demonstraram efeitos significativos, no caso do atributo “cor” (Tabela 23), para tratamento ( $p = 0,0304$ ) e tempo de armazenamento ( $p = 0,0480$ ). Para a interação tempo x tratamento, não houve diferença significativa ( $p = 0,8690$ ). Foi possível observar que o *Mincéd* com adição de Hijiki,  $50 \mu\text{g/mL}$ , foi o que apresentou maior alteração na cor, detectada pelos provadores. Os outros tratamentos, estatisticamente, não diferiram entre si. Para o tempo de armazenamento, observou-se um aumento gradativo na alteração da cor, durante os 180 dias.

Tabela 23- Análise sensorial para o atributo “cor”, do *Minced* de tilápia

Tratamentos	Dias de armazenamento				p=
	0	60	120	180	
Sem antioxidante	1,62	1,62	1,75	1,80	1,70 <sup>b</sup>
BHT: 100 µg/mL	1,12	1,62	1,37	2,20	1,58 <sup>b</sup>
Nori: 25 µg/mL	1,85	1,47	1,75	2,00	1,77 <sup>ab</sup>
Nori: 50 µg/mL	2,40	2,30	2,62	3,00	2,58 <sup>ab</sup>
Hijiki: 25 µg/mL	1,77	2,62	2,50	2,65	2,38 <sup>ab</sup>
Hijiki: 50 µg/mL	3,10	3,07	4,12	4,00	3,57 <sup>a</sup>
p= 0,0480	1,98 <sup>B</sup>	2,12 <sup>AB</sup>	2,35 <sup>AB</sup>	2,61 <sup>A</sup>	

Erro padrão para tratamento: 0,32; para tempo: 0,18. Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

No caso do atributo “aroma de ranço” (Tabela 24), o tempo de armazenamento influenciou nos resultados (p= 0,0086). Porém, para tratamento (p= 0,3374) e a interação tempo x tratamento (p=0,5605), não houve diferença significativa a 5%. As notas da análise sensorial estão apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24- Análise sensorial para o atributo “aroma de ranço”, do *Minced* de tilápia

Tratamentos	Dias de armazenamento			
	0	60	120	180
Sem antioxidante	1,87	2,00	2,12	2,15
BHT: 100 µg/mL	1,37	2,37	1,75	2,35
Nori: 25 µg/mL	1,42	1,12	2,12	2,65
Nori: 50 µg/mL	2,07	1,82	1,87	3,65
Hijiki: 25 µg/mL	1,60	2,05	2,12	2,15
Hijiki: 50 µg/mL	1,75	2,30	3,00	3,00
p= 0,0086	1,68 <sup>B</sup>	1,95 <sup>AB</sup>	2,17 <sup>AB</sup>	2,65 <sup>A</sup>

Erro padrão para tempo de armazenamento: 0,18. Médias (n=3) seguidas por letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a análise sensorial, os provadores não detectaram diferença para o “aroma de ranço” entre as amostras de *Minced*, ou seja, independente da aplicação de algas marinhas ou do antioxidante sintético BHT, o *Minced* apresentou, estatisticamente, frente aos provadores, o mesmo “aroma de ranço” da amostra controle. Este aroma, no entanto, pode ser desconsiderado, frente à escala de 1 (ausência) a 9 (intenso) presente na ficha disponibilizada aos provadores. A diferença foi somente detectada com relação ao tempo de armazenamento, sendo as amostras submetidas a 180 dias, as que apresentaram maiores notas para o “aroma de ranço”.

Trabalhos disponíveis na literatura sobre análise sensorial, envolvendo aplicação de algas marinhas são escassos. Prabhasankar et al. (2009) aplicaram a alga Wakame, em diferentes proporções, em uma nova formulação de macarrão, e avaliaram o sabor e a aparência. As formulações com menores proporções da alga, 5 e 10% (m/m) foram as mais aceitas pelos provadores.

## 6 CONCLUSÃO

As algas marinhas Nori, Kombu, Hijiki e Wakame, quando comparadas a outros tipos de algas, apresentam alto teor de compostos fenólicos. Em geral, a extração mais eficiente foi a correspondente ao etanol 60% (v/v), com dois dias de extração em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Na atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres DPPH, as algas Nori e Hijiki se sobressaíram, com atividade semelhante ao  $\alpha$ -tocoferol. Pelo método da inibição da oxidação acoplada do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, as mais bioativas foram as algas Nori e Kombu. Houve correlação positiva entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos presentes nas algas.

Quanto à atividade antimicrobiana, todos os extratos de algas extraídos com etanol 100% (v/v) foram bioativos. Os extratos apresentaram atividade inibitória e bactericida contra *Klebsiella pneumoniae* e somente inibitória contra *Listeria monocytogenes*.

Os principais compostos identificados pela análise cromatográfica foram, na Nori, os ácidos clorogênico, vanílico e caféico, além dos aminoácidos como alanina, glicina, valina e prolina; bem como, glicose e sorbitol. Na alga Hijiki foram detectados os ácidos clorogênico, caféico e cinâmico; alanina e prolina; xilitol e ribitol, frutose e ácido linoléico.

Quanto à atividade antioxidante por métodos de oxidação acelerada, no caso do Rancimat, os extratos de Nori e Hijiki (com exceção de Hijiki 100  $\mu$ g/mL), apresentaram atividade semelhante ou maior que a do antioxidante sintético BHT. Para o método do Oxipres, nenhum extrato foi tão eficiente quanto o BHT e houve uma tendência de ação pró-oxidante com o aumento da concentração dos extratos das algas marinhas Nori e Hijiki.

Para o estudo de vida útil, a aplicação dos extratos de algas marinhas não influenciou na composição centesimal e no pH. Para BNVT a aplicação das algas mostrou-se eficiente no controle da produção desses compostos, porém em TBARS, apesar de estarem dentro dos limites aceitáveis de oxidação, os extratos de algas apresentaram um comportamento pró-oxidante. No monitoramento microbiológico, as amostras atenderam à legislação vigente, sendo, portanto, microbiologicamente

seguras. Na análise sensorial, os provadores detectaram mínimas diferenças na cor do produto, porém não detectaram diferença para o “aroma de ranço”. No geral, os tratamentos de *Minced* de tilápia mantiveram-se dentro dos padrões de qualidade durante os 180 dias de armazenamento congelado.

Observou-se, a diferença de resposta na atividade antioxidante das algas marinhas de acordo com o método utilizado. O estudo *in vitro* e por métodos de oxidação acelerada das atividades biológicas como forma de seleção dos extratos bioativos de produtos naturais, deve ser recomendado.

## REFERENCIAS

AGUILERA-MORALES, M.; CASAS-VALDEZ, M.; CARRILLO-DOMÍNGUEZ, S.; GONZÁLEZ-ACOSTA, B.; PÉREZ-GIL, F. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.18, n.1, p.79-88, 2005.

AHN, C.B.; JEON, Y.J.; KANG, D.S.; SHIN, T.S.; JUNG, B.M. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. **Food Research International**, Essex, v. 37, p. 253-258, 2004.

ALBUQUERQUE, W.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; VIEIRA, G.H.F. Isolamento de *Staphylococcus aureus* do gelo, água, bancadas e vendedores de pescado da feira do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 31, n. 3, p. 299-303, 2006.

AL-KAHTANI, H.A.; ABU-TARBOUSH, H.M.; BAJABER, A.S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in Tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 4, p. 1053-1055, 1996.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 7. ed. Champaign: AOCS, 2003.

ANDRADE, A.D.; RUBIRA, A.F.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. W3 fatty acids in freshwater fish from South Brasil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 72, n. 10, p. 1207-1210, 1995.

ANGELINI, M.F.C. **Desenvolvimento do produto de conveniência Quenelle de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 7, n. 1, p. 231-243, 1995.

ASCENCIO, S.D. **Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estádios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros *Hypnea* e *Gracilaria***. 2006. 135 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ATHUKORALA, Y.; KIM, K.N.; JEON, Y.J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 44, n. 1, p. 1065-1074, 2006.

BANSEMIR, A.; BLUME, M.; SCHRODER, S.; LINDEQUIST, U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 252, n. 1, p. 79-84, 2006.

BERGAMASCHI, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BOMBARDELLI, R.A.; SYPERRECK, M.A.; SANCHES, E.A. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 181-195, 2005.

BRAND, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 maio 1997. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2453>>. Acesso em: 01 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura, em conformidade ao anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 jul. 1999. Seção 1, p. 10. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2855>>. Acesso em: 01 jan. 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Estatística da pesca 2004 – Brasil**: grandes regiões e unidades da confederação. Brasília, DF: IBAMA, 2005. 136 p. Disponível em: [www.ibama.gov.br/category/40?download=2457%3A2004.pdf](http://www.ibama.gov.br/category/40?download=2457%3A2004.pdf). Acesso em: 20 jun. 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Estatística de pesca 2006- Brasil**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, DF: IBAMA, 2007. 108 p. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/ma/wp-content/files/boletim\\_2006.pdf](http://www.ibama.gov.br/ma/wp-content/files/boletim_2006.pdf). Acesso em: 04 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA)**. Pescados e derivados, C.7, seção 1, Brasília, DF, 1952. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf). Acesso em: 30 set. 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção pesqueira e aquícola, estatística 2008/2009**. Brasília, DF, 2011. 37 p. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Poder Executivo, 10 jan. 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol./12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol./12_01rdc.htm)>. Acesso em 04 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Disponível em: [http://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_2011.html](http://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_2011.html). Acesso em: 30 jan. 2011.

BRASIL FOOD TRENDS 2020. São Paulo: FIESP; ITAL, 2010. 173 p. Disponível em: <[http://www.brazilfoodtrends.com.br/Brasil\\_Food\\_Trends/index.htm](http://www.brazilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/index.htm)>. Acesso em: 21 de out. 2010.

BUCK, C.B.; THOMPSON, C.D.; ROBERTS, J.N.; MULLER, M.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. **PLoS Pathogens**, San Francisco, CA, v. 2, p. 671-680, 2006.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CABRAL, I.S.R.; SHIRAHIGUE, L.D.; PRADO, A.; ARRUDA, L.F. DE; BOMBARDE, T.A.D.; VIEIRA, A.F.; VASCONCELOS, J.S.; TRAVAGIN, L.G.F.; ALENCAR, S.M.; OETTERER, M. Preparation of seaweeds extracts and their influence on the phenolic composition and antioxidant activity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYPHENOLS, 25., 2010, Montpellier, France. **Polyphenols communications**. Montpellier: INRA, 2010. v. 2, p.343-344.

CAHYANA, A.H.; SHUTO, Y.; KINOSHITA, Y. Sinergistic antioxidative effects of porphyrin derivatives with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 57, n.1, p. 1753, 1754, 1993.

CAMPO, V.L.; KAWANO, D.F.; DA SILVA, J.R.; CARVALHO, I. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis - a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 77, p. 167-180, 2009.

CAMPOS, V.B.; BARBARINO, E; LOURENÇO, S.O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 339-47, 2010.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, London, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARPES, S.T.; CABRAL, I.S.R.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Characterization of the antimicrobial potential of the bee pollen extracts from the south region of Brazil. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 271-277, 2009.

CARVALHO, L.R.; ROQUE, N.F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 757-764, 2000.

CLSI/NCCLS. **Norma M7-A6**. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. 6. ed. Wayne, PA, 2005. v. 23, n. 2

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. Métodos químicos para análise de pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos. **Controle de qualidade na indústria de pescados**. Santos: Loyola, 1988. p. 196-209.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Santiago: CECTA-USACH, 2002. 309 p.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia e Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DANISCO A/S. **Manual de Operacional e Analítico: Oxipres ML**. Copenhagen, Denamark, 2007. 15 p.

DAUGHERTY, K.B.; BIRD, T.K. Salinity and temperature effects on agar production from *Gracilaria verrucosa* strain G-16. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 75, p. 105-113, 1988.

DHARGALKAR, V.K.; VERLECAR, X.C. Southern Ocean seaweeds: a resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 287, n. 1, p. 229-242, 2009.

DUAN, X.J.; ZHANG, W.W.; LI, X.L.; WANG, B.G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, Barking, v. 95, p. 37-43, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ - caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUBBER, D.; HARDER, T. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 274, n. 1, p. 196-200, 2008.

DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 527-529, 2001.

DUTRA, M.P.; CARDOSO, G.C.; BORGES, A.E.; OLIVEIRA, C.A.; RAMOS, E.M.; RAMOS, A.L.; CARDOSO, M.G. Avaliação da oxidação lipídica de carne mecanicamente separada de frango adicionada de óleo essencial de casca d'anta (*Drimys brasiliensis* Miers). In: CONGRESSO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, 13., 2011, Buenos Aires, Argentina. 1 CD-ROM.

EMMONS, C.L.; PETERSON, D.M.; PAUL, G.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocopherol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 12, p. 4894-4898, 1999.

ESPAÑA. Real Decreto 2420/78, de 2 de junho de 1978. Se aprueba la Reglamentación técnica sanitaria para la elaboración y venta de conservas y semiconservas vegetales. **Boletín Oficial Del Estado**, Madrid, v. 1, n. 244, p. 23702, 12 dez.1978.

ESTUDO avalia possibilidade de cultivo de alga marinha exótica, 1998. Disponível em: <http://www.usp.br/agen/rede335.htm#USPpesquisa>. Acesso em: 20 out. 2011.

FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 73-76, 2006.

FALCÃO, J.P.; DIAS, A.M.G.; CORREA, E.E.; FALCÃO, D.Q. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 269-276, 2002.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Roma, 2010. 196 p.

FAO/WHO. Draft revised Standard for quick frozen blocks of fish fillets, "Minced" fish flesh and mixtures of fillets and "Minced" fish flesh (Appendix IV). In: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 21<sup>st</sup> Session the Codex Committee on Fish and Fishery Products. Roma: 1994. p. 47-57.

FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 84, p. 205-209, 2007.

FARIAS, W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I.L.; PIGNATARI, A.C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isolados em 12 hospitais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 199-204, 1997.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, London, v. 17, p. 7-55, 2000.

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 200 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FIGUEIREDO JÚNIOR, C.A.; VALENTE JÚNIOR, A.S. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 44., 2008, Rio Branco. **Anais...** Brasília, DF: SOBER, 2010. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/178.pdf>>. Acesso em: 23 out 2010.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, 1993.

GASPAR, J., LAIRES, A., MONTEIRO, M., LAUREANO, O., RAMOS, E., RUEFF, J. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 51-55, 1993.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 2289-2294, 2010.

GRYSCHER, S.F.B.; OETTERER, M.; GALLO, C.R. Characterization and frozen storage stability of *Minced Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)* and red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, v. 12, n. 3, p. 57-69, 2003.

GUERRA, N.B.; LAJOLO, F.M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 45-50, 2005.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 985-990, 1999.

HELLIO, C.; BREMER, G.; PONS, A.M.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 54, n. 4, p. 543-549, 2000.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 273-292, 2005.

HORTA, P.A. **Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil**: taxonomia e biogeografia. 2000. 301 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HUSS, H.H.; REILLY, A.; EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, Guildford, v. 11, n. 1, p. 149-156, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2008. 1020 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. Pescados y productos derivados. In: \_\_\_\_\_. **Microorganismos de los alimentos**: ecología microbiana de los productos alimentarios. Zaragoza: Acibria, 1998. p. 121-166.

ISMAIL, A.; HONG, T.S. Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. **Malaysian Journal of Nutrition**, Kuala Lumpur, v. 8, n. 2, p. 167-177, 2002.

JESUS, R.S.; LESSI, E.; TENUTA-FILHO, A. Estabilidade química e microbiológica de *Minced* fish de peixes amazônicos durante o congelamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 144-148, 2001.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. Analytical methods. In: SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. p. 4-10.

JUNG, M.Y.; MIN, D.B. Effects of  $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  Tocopherols on oxidative Stability of Soybean Oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 1464-1465, 1990.

KADAM, S.U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, Essex, v. 43, p.1975-1980, 2010.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. **Feed Mix- The International Journal on Feed, Nutrition and technology – Special: Alternatives to Antibiotics**, London, v. 1, n. 1, p. 19-21, 2000.

KARAWITA, R.; SIRIWARDHANA, N.; LEE, K.W.; HEO, M.S.; YEO, I.K.; LEE, Y.D.; JEON, Y.J. Reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing Power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 200, n. 1, p. 363-371, 2005.

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

KOIVIKKO, R.; LOPONEN, J.; PIHLAJA, K.; JORMALAINEN, V. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. **Phytochemistry Analysis**, New York, v. 18, n. 4, p. 326-332, 2008.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. São Paulo: Degaspari, 2000. 289 p.

KUDA, T.; GOTO, T.K.H.; SUZUKI, T.; YANO, T. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n. 1, p. 900-905, 2007.

KUHN, C.R.; SOARES, G.J.D. Proteases e inibidores no processo de surimi. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 5-11, 2002.

LAM, C.; HARDER, T. Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 43, n. 1, p. 874-881, 2007.

LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado**. 2005. 125 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LAUDICINA, D.C.; MARNETT, L.J. Enhancement of hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes by ascorbic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 278, n. 1, p. 73-80, 1990.

LEE, C.M. Surimi manufacturing and fabrication of surimi-based products. **Food Technology**, Chicago, v. 20, n. 3, p. 115-124, 1986.

LE TUTOUR, B. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 121-129. 1998.

LE TUTOUR, B.; BENSLIMANE, F.; GOULEAU, M.P.; GOUYGOU, J.P.; SALDAN, B.; QUEMENEUR, F. Antioxidative activities of algae extracts, synergistic effect with vitamin E. **Phytchemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 3759-3765, 1990.

LI, Y.; QIAN, Z.J.; RYU, B.; LEE, S.H.; KIM, M.M.; KIM, S.K. Chemical components and its antioxidant properties "in vitro": an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v. 17, n. 5, p. 1963-1973, 2009.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LUTHER, M.; PARRY, J.; MOORE, J.; MENG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, Z.; YU, L.L. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 1065–1073, 2007.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MARÉCHAL, J.P.; CULIOLIB, G.; HELLIOAB, C.; THOMAS-GUYONC, H.; CALLOWD, M.E.; CLAREA, A.S. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 313, p. 47-62, 2003.

MARENGONI, N.G.; POZZA, M.S.S.; BRAGA, G.C.; LAZZERI, D.B.; CASTILHA, L.D.; BUENO, G.W.; PASQUETTI, T.J.; POLESE, C. Caracterização microbiológica, sensorial e centesimal de fishburguers de carne de tilápia mecanicamente separada. **Revista Brasileira de Saúde de Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 168-176, 2009.

MARTIN, R.E.; GRAY, R.J.H.; PIERSON, M.O. Quality assessment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 5, p. 188-198, 1978.

MARTINO, R.; TAKAHASHI, N.S. A importância da adição de lipídeos em rações para a aquicultura. **Óleos e Grãos**, São Caetano do Sul, n. 58, p. 32-37, 2001.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1997.

McHUGH, D.J. (Ed). **A guide to the seaweed industry**. Roma: FAO, 2003. 118 p. (FAO Fisheries Technical Paper, 441).

MÉLO, H.M.G.; MOREIRA, R.T.; DÁLMAS, P.S.; MACIEL, M.I.S.; BARBOSA, J.M.; MENDES, E.S. Viabilidade da utilização da carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia do Nilo na elaboração de um produto tipo “mortadela”. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 22-29, 2011.

MELLO, S.C.R.P.; FREITAS, M.Q.; CLEMENTE, S.C.S.; FRANCO, R.M.; NOGUEIRA, E.B.; PINTO, M.D.S.R. Caracterização química e bacteriológica de polpa e surimi obtidos do espinhaço residual da filetagem de tilápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 648-653, 2010.

MEDINA, I.; GONSALEZ, M.J.; PAZOS, M.; MEDAGLIA, D.D.; SACCHI, R.; GALLARDO, J.M. Activity of plant extracts for preserving functional food containing n-3-PUFA. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 217, n. 4, p. 301-307, 2003. DOI 10.1007/s00217-003-0745-9.

MINOZZO, M.G.; WASZCZYNSKYJ, N.; BOSCOLO, W.R. Utilização de carne mecanicamente separada de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para a produção de patês cremoso e pastoso. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 315-319, 2008.

MONTERO, P.; GIMENEZ, B.; PEREZ-MATEOS, M.; GOMEZ-GUILLEN, M.C. Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. **Food Chemistry**, Barking, v. 93, n. 1, p. 17-23, 2005.

MOODY, J.A. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution. In: ISENBERG, H.D. (Ed.). **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003. p. 1–28.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos polinsaturados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 103-133, 2003.

MORRISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.; GALVIN, K.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, n. 1, p. 73-86, 1998.

NAHAS, R.; ABATIS, D.; ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, n. 1, p. 577-581, 2007.

NAGAI, T.; YUKIMOTO, T. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, p. 327-332, 2003.

NAGAYAMA, K.; IWAMURA, Y.; SHIBATA, T.; HIRAYAMA, I.; NAKAMURA, T. Bactericidal activity phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 50, p. 889-893, 2002.

NEIVA, C.P.R. **Processamento, avaliação nutricional e aceitabilidade de produtos à base de pescado desidratado: sopa e biscoito**. 2008. 163 p. (Doutorado em Saúde Coletiva) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NIELSEN, N.S.; DEBNATH, D.; JACOBSEN, C. Oxidative stability of fish oil enriched drinking yoghurt. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, n.1, p. 1478–1485, 2007.

NINAN, G.; BINDU, J.; JOSEPH, J. Frozen storage studies of mince based products developed from tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peter 1852). **Fishery Technology**, Cochin, v. 45, n. 1, p. 35-42, 2008.

NOVAKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, London, v. 68, n. 1, p. 908-918, 2006.

NORDBERG, J.; ARNÉR, S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200 p.

OETTERER, M.; COZZO DE SIQUEIRA, A.A.Z.; GRYSHECK, S.F.B. Tecnologias emergentes para processamento do pescado produzido em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; CASTAGNOLLI, M. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Editora TecArt, 2004. p. 481-500.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. v. 1, 430 p.

OH, K.B.; LEE, J.H.; CHUNG, S.C.; SHIN, J.; SHIN, H.J.; KIM, H.K. Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 104-108, 2008.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, E.C. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 7, p. 24-26, 1997.

OLIVEIRA FILHO, P.R.C.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; TRIANDE, M.A.; BALIEIRO, J.C.C.; VIEGAS, E.M.M. Quality of sausage elaborated using *Minced* Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 2, p. 183-190, 2010.

ONOFREJOVÁ, L.; VASICKOVÁ, J.; KLEJDUS, B.; STRATIL, P.; MISURCOVÁ, L.; KRÁCMAR, S.; KOPECKY, J.; VACEK, J. Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 464-470, 2010.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OZDEMIR, G.; HORZUM, Z.; SUKATAR, A.; KARABAY-YAVASOGLU, N.U. Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Cystoceira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 44, n. 3, p. 183-188, 2006.

PIEIDADE, K.R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados**. 2007. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIRES, A. Piscicultura e Meio Ambiente: boas práticas de manejo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados, MS, 2007. 1 CD-ROM.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

PRABHASANKAR, P.; GANESA, P.; BHASKAR, N.; HIROSE, A.; STEPHEN N.; GOWDA, L.R.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 1, p. 501-508, 2009.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 553 p.

QI, H. M., ZHANG, Q. B., ZHAO, T. T., CHEN, R., ZHANG, H., NIU, X. Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 37, p. 195-199, 2005.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

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

REBLOVÁ, Z. The effect of temperature on the antioxidant activity of tocopherols. **European Journal of Lipid Science Technology**, Weinheim, v. 108, p. 858-863, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1, p. 80–84, 2005.

ROCHA, I.P. Aqüicultura: um excelente negócio. **Revista Brasileira de Agropecuária**, São Paulo, v. 11, p. 6-12, 2001.

ROCHA, F.D.; PEREIRA, R.C.; KAPLAN, M.A.C.; TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinífera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n.1, p. 238-244, 2008.

RUIZ, F.S. **Tecnologia de alimentos de conveniência funcionais: feijão integral instantâneo**. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/palestra18.pdf>  
Acesso em: 07 nov. 2011.

RUPEREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 840-845, 2002.

SANCHEZ-ALONSO, I.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F.; BORDERIAS, A.J. Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in “Minced” fish: Evaluation by different methodologies. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 1, p. 372–378, 2007.

SÁNCHEZ-ALONSO, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F.; BORDERIAS, A.J. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 42-50, 2008.

SANT'ANA, L.S.; MANCINI-FILHO, J. Ação antioxidante de extratos de alecrim (*Rosemary officinalis* L.) em filés de peixe da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus Holmberg*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 1, p. 27-31, 1999.

SANTOS, W.A.; GOMES, E.A. Importância econômica dos costões rochosos. **Saúde & Ambiente em Revista**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 51-59, 2006.

SANTOSO, J.; YOSHIE, Y.; SUZUKI, T. The distribution and profile of nutrients and catechins of some Indonesian seaweeds. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 68, p. 1647-1648, 2002. Supplement.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS. **SAS user's guide basics**. Cary, NC: SAS Institute, 2002-2008.

SAVAY DA SILVA, L.K. **Desenvolvimento do produto de conveniência: tilápia (*Oreochromis niloticus*) refrigerada minimamente processada embalada a vácuo – padronização para a rastreabilidade**. 2009. 315 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SAVAY DA SILVA, L.K.; RIGGO, R.; MARTINS, P.E.; GALVÃO, J.A.; OETTERER, M. Otimização e padronização do uso da metodologia para determinação de bases nitrogenadas voláteis totais (BNVT) em camarões *Xyphopenaeus kroyeri*. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Campinas, v. 20, p. 138-144, 2008.

SCHELZ, Z., MOLNAR, J., HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. **Fitoterapia**. Milano, v. 77, n. 1, p. 279–285, 2006.

SERDAROGLU, M.; FELEKOGLU, E. Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) mince. **Journal of Food Quality**, Westport, v. 28, n. 2, p. 109-120, 2005.

SIDDAIAH, D.; REDDY, G.V.S.; RAJU, C.V.; CHANDRASEKHAR, T.C. Changes in lipids, protein and kamaboko forming ability of silver carp *Minced* during frozen storage. **Food Research International**, Essex, v. 34, n. 1, p. 47-53, 2001.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 2010. 552 p.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.

SIRIWARDHANA, N.; LEE, K.W.; KIM, S.H.; HA, W.J.; JEON, Y.J. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. **Food Science and Technology International**, London, v. 9, n. 1, p. 339-346, 2003.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES, V.F.M.; VALE, S.R.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, B.A. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 462-470, 1998.

SOUSA, M.B.; PIRES, K.M.S.; ALENCAR, D.B.; SAMPAIO, A.H.; SAKER-SAMPAIO, S.  $\alpha$ ,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em algas marinhas "in natura". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 953-958, 2008.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TANG, S.; KERRY, J.P.; SHEEHAN, D.; JOE BUCKLEY, MORRISSEY, P.A. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Research International**, Essex, v. 34, n. 8, p. 651-657, 2001.

TAKAMATSU, S.; HODGES, T.W.; RAJBHANDARI, I.; GERWICK, W.H.; HAMANN, M.T.; NAGLE, D.G. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 66, p. 605-608, 2003.

TENUTA FILHO, A.; JESUS, R.S. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria-prima industrial. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 59-64, 2003.

TROJAKOVA, L., ABLOVA, Z.; NGWEN, H.T.T; POKORNY, A. Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapessed oil. **Journal of Food Lipids**, New York, v. 8, p. 1-13, 2001.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. **Algae: an introduction to physiology**. Cambridge: Academic Press, 1997. 1 v.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2003. 380 p.

VIGGIANO, C.E. O produto dietético no Brasil e sua importância para indivíduos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2003

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

WANG, B.G.; ZHANG, W.W.; DUAN X.J.; LI, X.M. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). **Food Chemistry**, Barking, v. 113, p. 1101-1105, 2009.

YAN, X.; CHUDA, Y.; SUZUKI, M.; NAGATA, T. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 605-607, 1999.

YAMASAKI, M.; OGURA, K.; HASHIMOTO, W.; MIKAMI, B.; MURATA, K. A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 352, p. 11-21, 2005.

YEN, C.C.; DUTH, P.D. The relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 1, p. 67-70, 1993.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y.; PENG, H.H. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 1, p. 30-34, 1997.

YOSHIE-STARK, Y.; HSIEH, Y.P.; SUZUKI, T. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. **Journal of Tokyo University of Fisheries**, Tokyo, v. 89, n. 1, p. 1-6, 2003.

YUAN, Y.V.; BONE, D.E.; CARRINGTON, A. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmate*) extract evaluated "in vitro". **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 485-494, 2005.

YUAN, Y.V.; WALSH, N.A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food and Chemistry Toxicology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 1144-1150, 2006.

ZHANG, Q.; LI, N.; LIU, X.; ZHAO, Z.; LI, Z.; XU, Z. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its "in vivo" antioxidant activity. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 105-111, 2004.

ZHOU, G.F.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. "In vivo" antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus Ocellatus*. **Pharmacological Research**, London, v. 50, p. 47-53, 2004.

ZHOU, G.F.; XIN, H.; SHENG, W.; SUN, Y.; LI, Z.; XU, Z. "In vivo" growth-inhibition of S180 tumor by mixture of %Fu and low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus Ocellatus*. **Pharmacological Research**, London, v. 51, p. 153-157, 2005.

**ANEXOS**

## Anexo A: Aprovação do comitê de ética na pesquisa – ESALQ/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"



Av. Pádua Dias, 11 • Caixa Postal 9 • Cep 13418-900 • Piracicaba, SP - Brasil  
Fone (19) 3429-4100 • Fax (19) 3422-5925  
<http://www.esalq.usp.br>

COET/127  
Piracicaba, 22 de setembro de 2011

Ilm<sup>as</sup>. Sr<sup>as</sup>.  
Ms. Ingridy Simone Ribeiro Cabral

Prezada Doutoranda:

Comunico que o Projeto de Pesquisa, com o Protocolo nº 94, intitulado "Extratos de algas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*)", foi aprovado pelo Comitê de Ética da ESALQ, em 21 de setembro de 2011.

Atenciosamente,

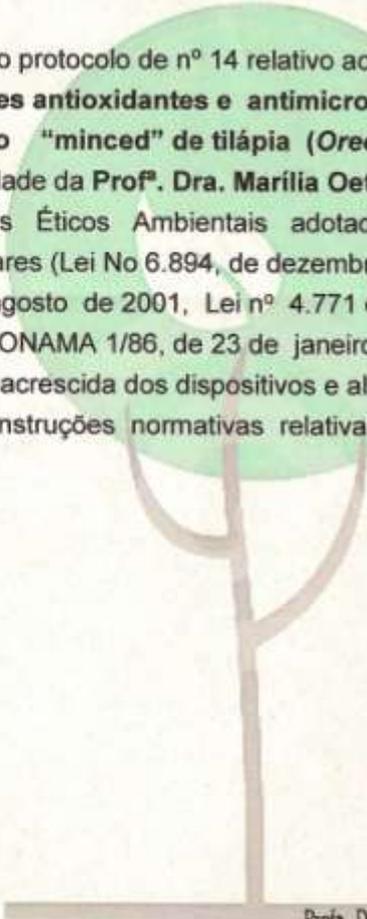
Prof. Dr. Errani Porto  
Coordenador do CEP/ESALQ

## Anexo B: Aprovação da Comissão de ética ambiental na pesquisa – ESALQ/USP

**COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP****PARECER**

Declaro que o protocolo de nº 14 relativo ao projeto "**Extratos de algas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade do "minced" de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**", de responsabilidade da **Profª. Dra. Marília Oetterer (LAN)**, está de acordo com os Princípios Éticos Ambientais adotados das leis e decretos complementares (Lei No 6.894, de dezembro de 1980, Medida Provisória no 2166-67 de agosto de 2001, Lei nº 4.771 de 15 de setembro de 1965, Resolução CONAMA 1/86, de 23 de janeiro de 1986, NBR1004 de setembro 1987(ABNT) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas relativas aos assuntos ambientais pertinentes.

Piracicaba, 19 de março 2009.



Profª. Dra. Maria do Carmo Bittencourt Oliveira  
Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa  
Coordenadora CEAP / ESALQ / USP  
*Maria do Carmo Bittencourt Oliveira*  
Profª. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira  
Presidente – CEAP  
ESALQ/USP