



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

Inclusão da microalga (*Phaedactylum tricornutum*) em rações de acabamento para dourada: efeito na pigmentação e outros atributos da qualidade

Mónica Isabel Botas Barbeiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Trabalho efectuado sob a orientação da Doutora Amparo Celeste Gonçalves (Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Departamento do Mar e Recursos Marinhos, Divisão de Aquacultura e Valorização) e da Doutora Elsa Cabrita (Centro de Ciências do Mar, Grupo de Investigação de Aquacultura, Universidade do Algarve).

2015

Mónica Isabel Botas Barbeiro

Inclusão da microalga (*Phaedactylum tricornutum*) em
rações de acabamento para dourada: efeito na pigmentação e
outros atributos da qualidade

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve referente ao Mestrado
em Aquacultura e Pescas – especialização em Aquacultura

2015

Inclusão da microalga (*Phaedactylum tricornutum*) em rações de acabamento para dourada: efeito na pigmentação e outros atributos da qualidade

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Mónica Isabel Botas Barbeiro

Copyright © A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização desta dissertação tornou-se possível devido à benesse e colaboração de várias entidades e pessoas. Deste modo, quero expressar o meu agradecimento, em especial:

À Doutora Amparo Gonçalves por ter aceitado ser a minha orientadora. Agradeço toda a disponibilidade e todo o apoio e motivação que me deu desde a realização do trabalho experimental à elaboração da dissertação.

À Doutora Elsa Cabrita por ter aceitado também a responsabilidade pela minha orientação, pela disponibilidade e apoio demonstrados.

À Senhora Engenheira Maria Leonor Nunes por me ter recebido no IPMA, disponibilizando recursos que me permitiram realizar o trabalho experimental.

Ao Doutor Jorge Dias e à SPAROS pelo fornecimento e formulação das rações.

Ao Sr. João Navalho e Sra. Joana Silva da empresa A4F-Algas Para o Futuro (Portugal) por fornecer as biomassas da microalga utilizada neste estudo, produzidas no âmbito do projecto EU FP7-GIAVAP No. 266401: Melhoramento Genético de Algas para um Produto de Valor Acrescentado.

Ao Doutor Tomé Silva pela disponibilidade e grande ajuda na estatística circular.

Ao painel sensorial, Amparo Gonçalves, António pereira, Carla Pires, Manuel Pires, Teresa Gama Pereira e Rui Silva, pela sua disponibilidade e empenho na participação das sessões de avaliação sensorial.

À Professora Doutora Maria Luísa de Carvalho por toda a disponibilidade que teve ao receber-me no Centro de Física Atómica da Universidade de Lisboa, pela utilização dos laboratórios e materiais necessários que tornaram possível a determinação dos elementos minerais e metálicos nas minhas amostras.

À Margarida Saavedra, Teresa Pereira, Oksana Radelytska e Júlia Ferreira por toda a ajuda prestada relativamente à amostragem e análises químicas.

A todos os colegas e amigos, que de algum modo me apoiaram e ajudaram.

E por último mas não menos importante, um enorme agradecimento à minha família.

Resumo

As microalgas têm um grande potencial no sector da alimentação animal como um ingrediente funcional (produtos incorporados na alimentação para fornecer um benefício além do preenchimento das necessidades nutricionais básicas). A cor é um atributo sensorial de grande importância que fornece a informação básica de qualidade para a percepção humana, e tem uma estreita associação com factores de qualidade como a frescura, sendo um importante factor de classificação para a maioria dos produtos alimentares. A cor da pele do peixe é altamente dependente da presença de carotenóides na dieta.

O objectivo deste estudo foi investigar os efeitos da incorporação de uma biomassa microalgal (*Phaedactylum tricornutum*), em rações de acabamento, MA20 (estirpe selvagem) e MA37 (estirpe geneticamente modificada) para dourada (*Sparus aurata*) sobre a qualidade desta espécie, particularmente na pigmentação. As duas dietas experimentais foram testadas em comparação com a dieta controlo (CTRL), durante 84 dias. O ensaio decorreu em duplicado, nas instalações do CCMAR e as dietas foram formuladas e preparadas pela SPAROS Lda.

A determinação instrumental da cor foi realizada na pele e no músculo de dourada, obtendo-se as coordenadas L*, a* e b* do sistema CIELAB. Estas coordenadas permitiram calcular o *hue* (H°), que indica a cor do produto, croma (C*), que indica a saturação (intensidade) de cor e a brancura (W) do músculo. Realizou-se a avaliação sensorial e o painel avaliou a intensidade dos atributos sensoriais, em particular, sabor e odor. Determinou-se a composição química, os elementos minerais e metálicos e o perfil de ácidos gordos. O grau de oxidação lipídica foi determinado após um período (25 semanas) de armazenamento a -20 °C através do índice de polienos: $PI = (20:5n-3 + 22:6n-3)/16:0$.

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na pigmentação da mancha amarela no opérculo: peixes alimentados com as duas dietas suplementadas com a microalga (MA20 e MA37) diferiram significativamente do CTRL em termos de luminosidade (L*), em relação à saturação de cor (C*) apenas os peixes alimentados com a dieta MA37 diferiram significativamente do grupo CTRL. Após 25 semanas de armazenamento em congelado verificou-se uma diminuição semelhante dos valores de PI em todos os grupos, indicando a ausência de um efeito antioxidante da microalga.

A suplementação das dietas com as duas estirpes de *P. tricornutum* não comprometeu as propriedades sensoriais nem o valor nutricional das douradas.

Palavras-chave: *Sparus aurata*; *Phaedactylum tricornutum*; pigmentação; qualidade

Abstract

Microalgae have a great potential in the animal feed sector as a functional ingredient (products incorporated in the feed to provide a benefit beyond fulfilling the basic nutritional needs). Colour is an important sensorial attribute to provide basic quality information for human perception, and has close association with quality factors such as freshness, therefore is an important grading factor for most food products. In the case of fish skin colour is highly dependent on the carotenoids present in the diet.

The aim of this study was to investigate the effects of incorporating a microalgal biomass (*Phaedactylum tricornutum*) in feeds, MA20 (wild strain) e MA37 (genetically modified strain) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) on the quality of this species, particularly in pigmentation. This microalgae was incorporated during the finishing stage production of this species. Both experimental diets were compared with the control diet (CTRL) over a period of 84 days, in duplicate tanks, at CCMAR facilities and diets were formulated and prepared by SPAROS Lda.

The instrumental colour was measured in the skin and muscle of gilthead seabream, obtaining the coordinates L*, a* and b* of the CIELAB system. The colour coordinates obtained allowed to calculate the hue (H°), indicating the product colour, chroma (C*), which indicates the colour saturation and whiteness (W). Sensory evaluation was carried out and the panellists evaluated the intensity of sensory attributes in particular taste and odour. The proximate composition, minerals and metallic elements and fatty acids profile were determined. The degree of lipid oxidation was determined after a period (25 weeks) of storage at -20 °C through polyene index: $PI = (20:5n-3 + 22:6n-3)/16:0$.

Significant differences were observed ($P < 0.05$) in the pigmentation of the yellow spot on the operculum: fish fed both supplemented microalgae diets (MA20 and MA37) differ significantly from CTRL in terms of lightness (L*), whereas regarding colour saturation (C*) only fish fed diet MA37 differed significantly from the CTRL fish. After 25 weeks of frozen storage a similar decrease in PI values were observed in all groups, indicating the absence of an antioxidant effect of the microalgae. The supplementation of diets with both strains of *P. tricornutum* did not affect the sensory properties or nutritional value of seabream.

Key-words: *Sparus aurata*; *Phaedactylum tricornutum*; pigmentation; quality

Índice Geral

Agradecimentos	IV
Resumo.....	V
Abstract	VII
Índice Geral	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Abreviaturas e Acrónimos.....	XIV
1. Introdução.....	- 1 -
1.1 Dimensão e importância da pesca e aquacultura.....	- 1 -
1.2 Dourada (<i>Sparus aurata</i>).....	- 4 -
1.2.1 Características principais da espécie.....	- 4 -
1.2.2 Distribuição geográfica, habitat e biologia reprodutiva.....	- 5 -
1.2.3 Sistemas de produção da espécie	- 6 -
1.2.4 Produção e interesse comercial	- 7 -
1.3 Qualidade dos produtos de aquacultura.....	- 7 -
1.3.1 Composição química do pescado	- 8 -
1.3.2 Alterações na qualidade.....	- 11 -
1.3.2.1 Oxidação lipídica	- 11 -
1.3.3 Métodos de avaliação da qualidade do pescado	- 11 -
1.3.3.1 Avaliação sensorial	- 11 -
1.3.3.2 Determinação instrumental da cor	- 13 -
1.4 Dieta: influência na qualidade do pescado; alternativa à farinha e óleo de peixe; factor apelativo (como ingrediente funcional).....	- 14 -
1.5 Microalgas	- 15 -
1.5.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	- 17 -
1.5.1.1 <i>P. tricornutum</i> como fonte de PUFA	- 17 -
1.5.1.2 <i>P. tricornutum</i> como fonte de carotenóides.....	- 18 -
1.6 Carotenóides: função dos carotenóides; utilização em aquacultura.....	- 20 -
1.7 Objectivos.....	- 21 -
2. Material e Métodos.....	- 23 -
2.1 Material biológico	- 23 -
2.2 Amostragem	- 25 -
2.3 Métodos analíticos	- 26 -
2.3.1 Determinação instrumental da cor	- 26 -
2.3.2 Avaliação sensorial	- 28 -

2.3.3 Análises químicas e físicas no músculo	- 29 -
2.3.3.1 Composição química aproximada	- 30 -
2.3.3.2 Determinação do perfil de ácidos gordos	- 32 -
2.3.3.3 Determinação de elementos minerais e metálicos.....	- 33 -
2.3.3.4 Determinação do grau de oxidação lipídica	- 34 -
2.3.4 Análise estatística.....	- 35 -
3. Resultados	- 36 -
3.1 Peso e rendimento do filete.....	- 36 -
3.2 Cor	- 36 -
3.3 Avaliação sensorial	- 46 -
3.4 Composição química aproximada	- 47 -
3.5 Perfil de ácidos gordos	- 48 -
3.6 Elementos minerais e metálicos	- 51 -
3.7 Grau de oxidação lipídica	- 52 -
4. Discussão.....	- 55 -
4.1 Peso e rendimento do filete.....	- 55 -
4.2 Cor	- 55 -
4.3 Avaliação sensorial	- 60 -
4.4 Composição química aproximada	- 61 -
4.5 Perfil de ácidos gordos	- 61 -
4.6 Elementos minerais e metálicos	- 63 -
4.7 Grau de oxidação lipídica	- 64 -
5. Conclusões.....	- 66 -
6. Bibliografia	- 67 -

Índice de Figuras

FIGURA 1.1 – UTILIZAÇÃO E FORNECIMENTO DE PEIXE A NÍVEL MUNDIAL.	- 1 -
FIGURA 1.2 – CONSUMO DE PROTEÍNA <i>PER CAPITA</i> NO ANO DE 2009.....	- 3 -
FIGURA 1.3 - MANCHA NEGRA E BANDA FRONTAL DOURADA PRESENTES NA ESPÉCIE <i>S. AURATA</i>	- 5 -
FIGURA 1.4 - COMPOSIÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS DA ESPÉCIE <i>P. TRICORNUTUM</i>	- 18 -
FIGURA 1.5 - ESTRUTURA DA FUCOXANTINA E DOS SEUS METABOLITOS.	- 19 -
FIGURA 2.1 – TANQUES CIRCULARES DE 1000 L ONDE SE PROCEDEU AO CULTIVO DA ESPÉCIE <i>S. AURATA</i>	- 23 -
FIGURA 2.2 - ZONAS DO CORPO DE DOURADA UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DA COR DA PELE.....	- 27 -
FIGURA 2.3 - DIAGRAMA TRIDIMENSIONAL DO ESPAÇO DE COR CIELAB.....	- 28 -
FIGURA 2.4 - GABINETE DE PROVA PARA ANÁLISE SENSORIAL.....	- 29 -
FIGURA 2.5 - ESCALA LINEAR NÃO ESTRUTURADA USADA NA AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS.....	- 29 -
FIGURA 2.6 - A) BLOCO EM AÇO PARA PRENSA E B) PRENSA HIDRÁULICA.....	- 34 -
FIGURA 2.7 - A) PASTILHA E B) PREPARAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS.	- 34 -
FIGURA 3.1 - VALORES DE <i>HUE</i> , EM OPÉRCULO DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 37 -
FIGURA 3.2 - SATURAÇÃO DE COR (<i>C*</i>), EM OPÉRCULO DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 38 -
FIGURA 3.3 - VALORES DE <i>HUE</i> , EM TRÊS ZONAS DA BANDA INTERORBITAL DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 40 -
FIGURA 3.4 - SATURAÇÃO (<i>C*</i>), EM TRÊS ZONAS DA BANDA INTERORBITAL DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 41 -
FIGURA 3.5 - VALORES DE <i>HUE</i> , EM TRÊS ZONAS DA PELE DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 43 -
FIGURA 3.6 - SATURAÇÃO (<i>C*</i>), EM TRÊS ZONAS DA PELE DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 44 -

FIGURA 3.7 - BRANCURA (W), EM TRÊS ZONAS DO MÚSCULO DE DOURADA ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.- 46 -

FIGURA 3.8 - INTENSIDADE (%) DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS DE FILETES COZIDOS DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.- 47 -

FIGURA 3.9 - GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS, AO INÍCIO (PI T=0) E APÓS 25 SEMANAS DE CONGELAÇÃO (PI T=25).....- 53 -

Índice de Tabelas

TABELA 1.1 – UTILIZAÇÃO DA PESCARIA (CAPTURAS E AQUACULTURA) MUNDIAL.....	- 2 -
TABELA 1.2 - CLASSES E TEORES RELATIVOS DOS CAROTENÓIDES PRESENTES NA MICROALGA <i>P. TRICORNUTUM</i>	- 20 -
TABELA 2.1 - INGREDIENTES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS USADAS NO CULTIVO DAS DOURADAS.	- 25 -
TABELA 3.1 - PARÂMETROS DE COR EM OPÉRCULO DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 36 -
TABELA 3.2 - PARÂMETROS DE COR EM TRÊS ZONAS DA BANDA INTERORBITAL DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.	- 39 -
TABELA 3.3 - PARÂMETROS DE COR EM TRÊS ZONAS DA PELE DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.	- 42 -
TABELA 3.4 - PARÂMETROS DE COR EM TRÊS ZONAS DO MÚSCULO DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.	- 45 -
TABELA 3.5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA NO MÚSCULO DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.	- 48 -
TABELA 3.6 - PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS, EXPRESSO EM PORCENTAGEM (%) DOS ÁCIDOS GORDOS TOTAIS (BASE SECA). ..	- 49 -
TABELA 3.7 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS, EXPRESSA EM G/100G (BASE HÚMIDA).....	- 50 -
TABELA 3.8 - CONCENTRAÇÃO DE MACRO ELEMENTOS (S, CL, K E CA), ELEMENTOS TRAÇO (FE, CU, ZN E BR), ELEMENTOS ULTRA TRAÇO (AS) E ELEMENTOS METAIS (RB) (BASE HÚMIDA) EM MÚSCULO DE DOURADA, ALIMENTADA COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	- 51 -

Abreviaturas e Acrónimos

As abreviaturas e acrónimos presentes ao longo de todo o texto são apresentados na lista abaixo, por ordem alfabética, e com a correspondente definição. Quando aparecem inicialmente no texto entre parênteses, são explicadas. As abreviaturas e acrónimos são mantidos na forma em que são reconhecidos internacionalmente, sendo incluída a tradução mais próxima para a língua portuguesa.

AA - Ácido araquidónico (arachidonic acid)

ADQ - Análise descritiva quantitativa

AI - Índice de aterogenicidade (atherogenicity index)

CIE - Comissão Internacional de Iluminação (Commission Internationale de l'Eclairage)

DHA - Ácido docosahexaenóico (docosahexaenoic acid)

EPA - Ácido eicosapentaenóico (eicosapentaenoic acid)

EU - União Europeia (European Union)

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

EDXRF - Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva (Energy Dispersive X-ray Fluorescence)

FID - Detector de ionização de chama (Flame ionization detector)

FM - Farinha de peixe (fishmeal)

FO - Óleo de peixe (fish oil)

Fxn - Fucoxantina

GMO – Geneticamente modificada

MS – Matéria seca

PA – Ácido palmítico (palmitic acid)

PI – Índice de polienos (polyene index)

POA - Ácido palmitoleico (palmitoleic acid)

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados (polyunsaturated fatty acids)

TI - Índice de trombogenicidade (thrombogenicity index)

n-3 LCPUFAs - Ácidos gordos polinsaturados n-3 de cadeia longa (n-3 long chain polyunsaturated fatty acids)

1. Introdução

1.1 Dimensão e importância da pesca e aquicultura

A produção mundial de peixe, proveniente das capturas e aquicultura, tem crescido constantemente nas últimas cinco décadas, sendo que o fornecimento de peixe para fins alimentares teve um aumento de uma taxa média anual de 3,2%, ultrapassando assim o crescimento da população mundial em 1,6% (FAO, 2014). A proporção da produção pesqueira utilizada directamente para consumo humano aumentou de cerca de 71% em 1980 para mais de 86% (136 milhões de toneladas) em 2012, sendo o restante (21,7 milhões de toneladas) destinado a fins não alimentares (por exemplo, farinha e óleo de peixe) (Figura 1.1 e Tabela 1.1) (FAO, 2014). O consumo de peixe *per capita* aparente a nível mundial subiu de um valor médio de 9,9 kg na década de 1960 para 18,5 kg em 2010, com estimativas preliminares para 2012 que apontam para 19,2 kg (Figura 1.1 e Tabela 1.1) (FAO, 2014).

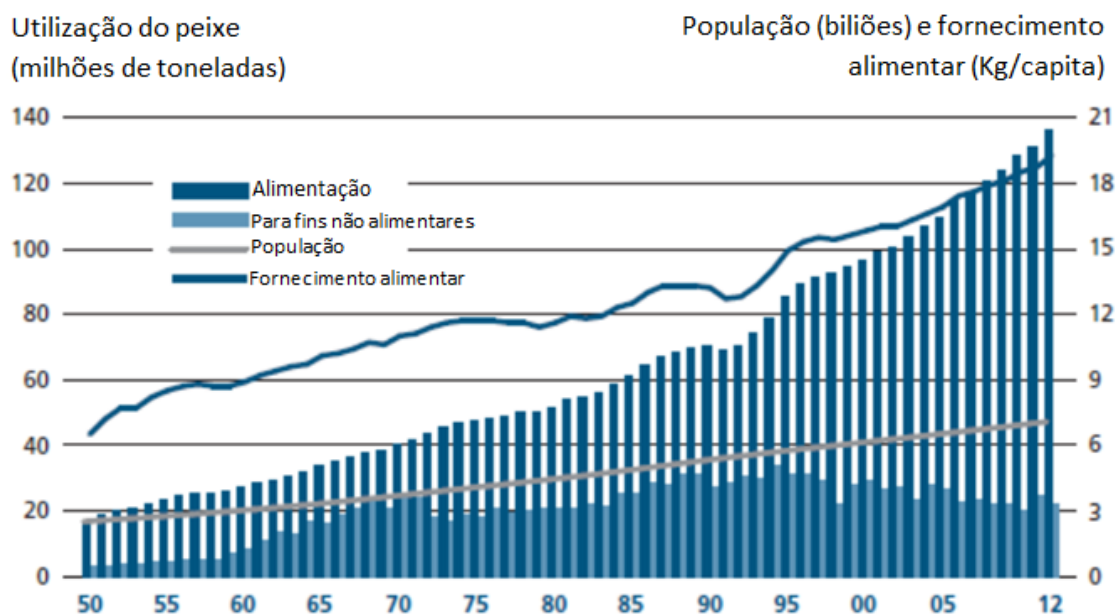


Figura 1.1 – Utilização e fornecimento de peixe a nível mundial (adaptado FAO, 2014).

Tabela 1.1 – Utilização da pescaria (capturas e aquacultura) mundial (adaptado FAO, 2014).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
	(Milhões de toneladas)					
Utilização ¹						
Consumo humano	117.3	120.9	123.7	128.2	131.2	136.2
Para fins não alimentares	23.4	22.2	22.1	19.9	24.5	21.7
População (bilhões)	6.7	6.8	6.8	6.9	7.0	7.1
Fornecimento de peixe para alimentação <i>per capita</i> (Kg)	17.6	17.9	18.1	18.5	18.7	19.2

Nota: Excluindo as plantas aquáticas. Os totais podem não corresponder devido aos arredondamentos.

¹Os dados deste sector para 2012 são estimativas provisórias.

No que respeita à União Europeia (EU), esta é considerada o maior mercado a nível mundial no consumo de produtos do mar, com, um consumo aparente de 12,3 milhões de toneladas em 2011. Destes 12,3 milhões de toneladas, 9,4 são provenientes das capturas, enquanto 2,9 são provenientes de aquacultura (EC, 2014).

O consumo de peixe da EU *per capita* em 2011 foi de 24,5 kg, sendo que 18,7 kg provieram das actividades da pesca, e 5,8 kg de aquacultura. Ainda na EU, o consumo *per capita* de proteína a partir de peixe e pescado foi de 6,8 g/dia no ano de 2009, sendo que Portugal ocupa o primeiro lugar no ranking (Figura 1.2) (EC, 2014).

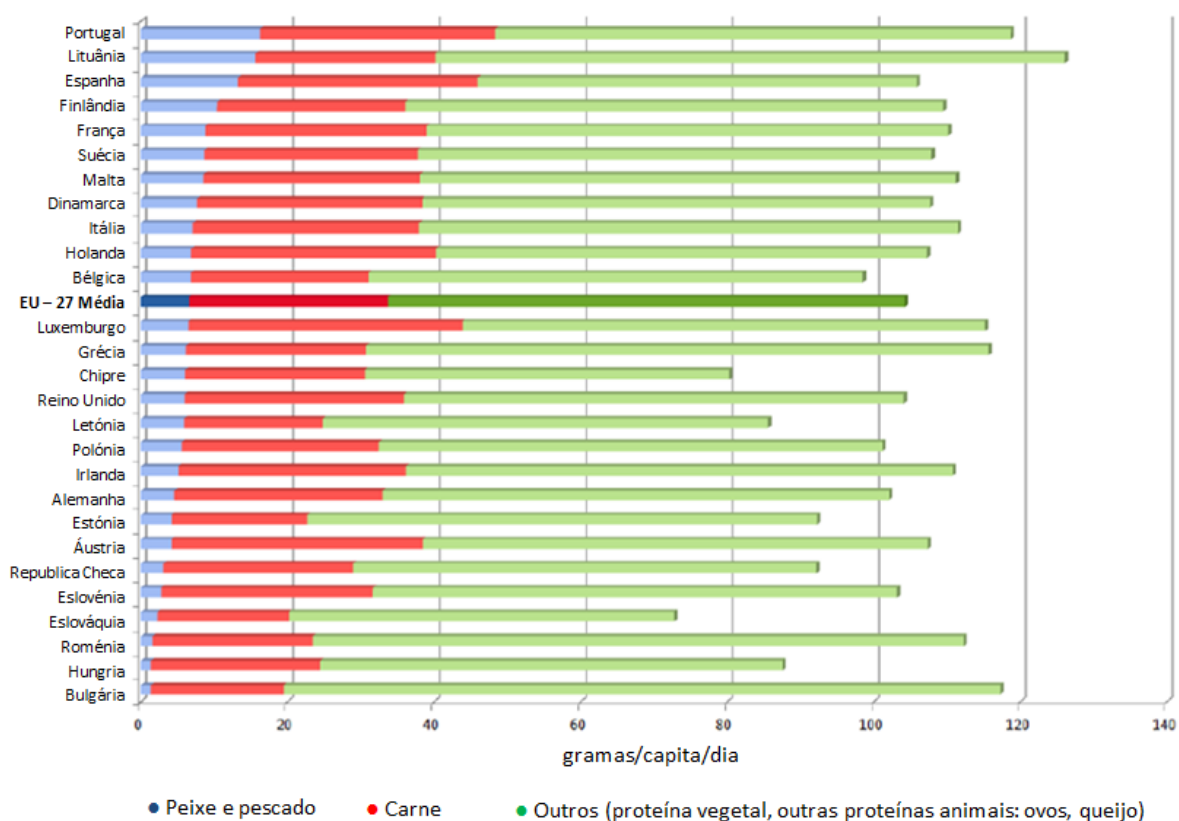


Figura 1.2 – Consumo de proteína *per capita* no ano de 2009 (adaptado EC, 2014).

Este desenvolvimento notável tem sido impulsionado pela combinação do crescimento populacional, subida de rendimentos e urbanização, e facilitado pela forte expansão da produção de peixe e canais de distribuição mais eficientes (FAO, 2014).

Focando apenas o ramo da aquacultura, a sua produção mundial atingiu um valor histórico de 90,4 milhões de toneladas (peso vivo) em 2012, dos quais 66,6 milhões de toneladas correspondem a peixe destinado para alimentação e os restantes 23,8 milhões de toneladas correspondem a algas aquáticas. No período de 2000-2012 esta produção aquícola mundial de peixe destinada a consumo humano cresceu a uma taxa média anual de 6,2%, passando de 32,4 para 66,6 milhões de toneladas (FAO, 2014). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estima que em 2013 esta produção subiu 5,8%, atingindo 70,5 milhões de toneladas, e a produção de algas aquáticas 26,1 milhões de toneladas. Só a China contribuiu com a produção de 43,5 milhões de toneladas de peixe para fins alimentares e 13,5 milhões de toneladas de algas aquáticas em 2013 (FAO, 2014).

Relativamente a Portugal, em 2012, a produção em aquacultura ascendeu a 10 317 toneladas o que gerou uma receita de 54 milhões de euros. Estes valores representaram

um aumento em quantidade (+12,2%) e um decréscimo em valor (-8,2%) relativamente a 2011, justificado pela redução dos preços médios de venda de algumas espécies de moluscos (INE, 2014). A produção em águas salobras e marinhas continua a ser a mais importante, e reforçou o seu peso em 2012, correspondendo a cerca de 95,4% da produção total. A produção de peixe em águas salobras e marinhas representou 57,3%, da qual 89,6% se refere a dourada e pregado (INE, 2014). O aumento na produção de peixes marinhos deveu-se essencialmente à maior produção de espécies como o pregado, robalo, dourada e linguados (INE, 2014).

A diminuição das capturas selvagens e o aumento da dependência mundial de peixe como fonte de alimento tem levado a um crescente interesse na aquacultura (Apt & Behrens, 1999). O ramo da aquacultura, onde a produção está em constante crescimento rapidamente oferecerá a maioria de todos os peixes consumidos pela população, pois a aquacultura é provavelmente o sector de produção alimentar que mais cresce e já é responsável por quase 50% do peixe de todo o mundo que é utilizado para a alimentação (FAO, 2014). Também os grandes avanços na tecnologia de reprodução, *design* do sistema e tecnologia de alimentação na segunda metade do século XX permitiram a expansão comercialmente viável da aquacultura quer em espécies quer em volume (FAO, 2013).

1.2 Dourada (*Sparus aurata*)

1.2.1 Características principais da espécie

A dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), pertence à família Sparidae e à ordem Perciformes (Basurco *et al.*, 2011). Possui o corpo oval, bastante profundo e comprimido; o perfil da cabeça é regularmente curvo; o olho é pequeno; a face é escamosa; o pré-opérculo é isento de escamas e a boca é baixa, oblíqua muito ligeiramente e os lábios são grossos (Fischer *et al.*, (Ed.) 1981). Apresenta uma cor cinza prateada; uma grande mancha negra que tem origem na linha lateral e que se estende sobre a margem superior do opérculo onde é delimitada por uma área avermelhada; uma banda frontal dourada entre os olhos (Figura 1.3) delimitada por duas áreas escuras (mal definidas em indivíduos jovens); linhas longitudinais escuras, muitas vezes presentes em ambos os lados do corpo; uma faixa escura na barbatana dorsal;

bifurcação e pontas da barbatana caudal delimitadas por uma coloração preta (Fischer *et al.*, (Ed.) 1981).

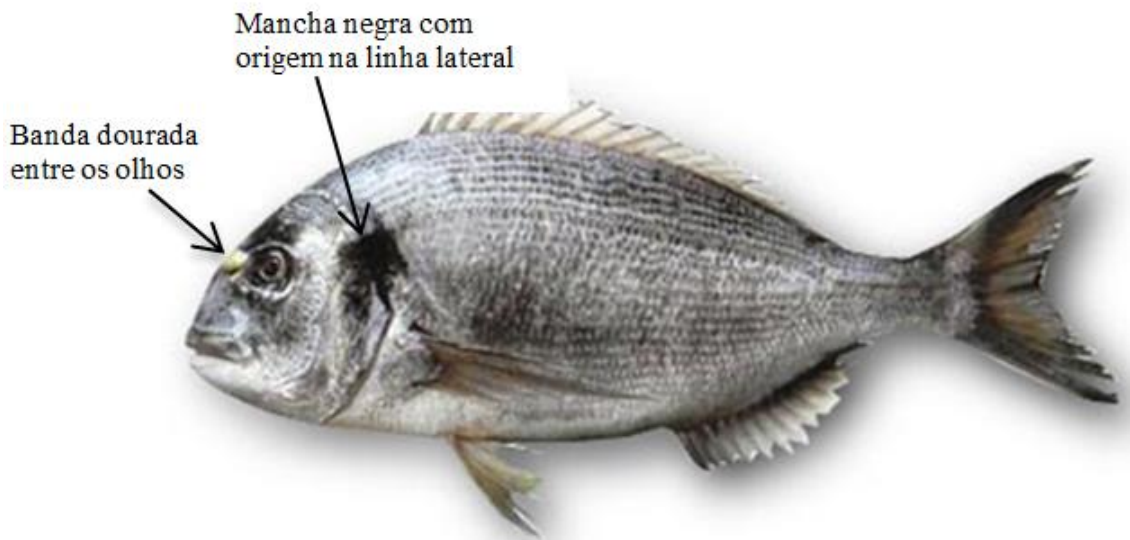


Figura 1.3 - Mancha negra e banda frontal dourada presentes na espécie *S. aurata* (Fonte: <http://www.fao.org/fishery/species/2384/en>).

1.2.2 Distribuição geográfica, habitat e biologia reprodutiva

A dourada distribui-se a partir do Estreito de Gibraltar a Cabo Verde e ao redor das ilhas Canárias, sendo também encontrada no Mediterrâneo e para norte da ilha Britânica (Fischer *et al.*, (Ed.) 1981).

É uma espécie bentopelágica, encontrada em ambientes costeiros, pradarias marinhas, fundos rochosos e arenosos, bem como na zona de rebentação e profundidades até cerca de 30m, sendo que os adultos podem ser encontrados até profundidades de 150m. Sendo a espécie eurialina, muitas vezes entra em águas salobras. É um peixe sedentário, solitário, que por vezes forma pequenos agregados; é principalmente carnívoro (moluscos, particularmente mexilhões, crustáceos e peixes) e acessoriamente herbívoro (Fischer *et al.*, (Ed.) 1981).

Em relação à biologia reprodutiva os machos tornam-se fêmeas por volta dos 3 anos de idade; é uma espécie protândrica hermafrodita, que matura primeiro como macho (durante o primeiro ou segundo ano de idade) (20-30cm) e após o segundo ou terceiro ano de idade (33-40cm) como fêmea (Bauchot *et al.*, 1981).

1.2.3 Sistemas de produção da espécie

Os sistemas de produção para a dourada são diversos, variando desde policultura extensiva (por exemplo *vallicoltura* em Itália e produção em lagunas no Egipto) ou produção semi-intensiva em tanques de terra (Portugal e Sul de Espanha) a sistemas *land-based* altamente intensivos (*raceways* ou tanques), jaulas no mar *inshore* (Grécia e Turquia) e *offshore* (Cyprus, Itália e Espanha) (Basurco *et al.*, 2011).

O tipo de cultura mais primitivo é o extensivo, que aproveita exclusivamente as condições naturais disponíveis e onde o controlo do sistema de produção é quase inexistente (Diniz, 1998). Neste regime, o cultivo dos animais é feito em lagoas terrestres (salinas, lagoas de antigos moinhos de maré) em que o repovoamento é feito com os juvenis que entram com as marés pelas comportas e o alimento resulta da produtividade natural do meio (Santinha, 1998). Os tanques podem sofrer algumas transformações, com o objectivo de melhorar a circulação hídrica, podendo ser introduzido algum complemento de alimento. As produções normalmente situam-se entre os 200 a 400 kg/ha/ano (Santinha, 1998).

No regime semi-intensivo, utilizam-se tanques de terra batida, de dimensões de 0,5 a 1 ha, construídos em locais que reúnem as condições para que estes sejam aí implantados. A produção é toda planificada (Santinha, 1998), recorrendo-se à reprodução artificial para obtenção de ovos e juvenis e à fase de engorda é fornecido alimento artificial complementar para aumentar o rendimento desta fase de crescimento (Diniz, 1998). A renovação da água realiza-se através de bombagem, embora nalguns casos se utilize parcialmente as marés. Utilizam-se arejadores quer para fornecimento de oxigénio quer para aumentar a movimentação da massa de água. A produção média é de 10 toneladas/ha/ano, podendo atingir o dobro, mediante o equipamento necessário (Santinha, 1998).

A cultura em regime intensivo é realizada em tanques sintéticos, construídos em fibra de vidro ou betão com dimensões entre os 100-1000 m³ com o objectivo de obter o máximo de autolimpeza de modo a não alterar a qualidade da água (Santinha, 1998). Caracteriza-se pela utilização de densidades de carga elevadas, existindo um elevado índice de controlo de todos os parâmetros de produção. De modo a aumentar o

rendimento do crescimento utilizam-se metodologias de manejo avançadas (Diniz, 1998). A alimentação é assegurada exclusivamente por alimento artificial e a produção varia entre 20-30 kg/m³ (Santinha, 1998).

1.2.4 Produção e interesse comercial

Na Europa, a procura de dourada fresca tem aumentado significativamente na última década, devido ao seu aroma desejável e qualidade, e, conseqüentemente, o seu elevado valor fez com que a aquacultura desta espécie se tenha tornado um negócio rentável (Alasalvar *et al.*, 2001; Yildiz *et al.*, 2006). Contudo a produção intensiva da dourada tem revelado sinais de saturação no mercado, e crise de preços (Grigorakis *et al.*, 2002). A produção global de douradas atingiu 167,827 toneladas em 2012, principalmente a partir de aquacultura (159,731 toneladas) (FAO-FishStat plus, 2014). Os principais países produtores são a Grécia, Turquia, Espanha e Egipto. A maioria da produção tem lugar no Mar Mediterrâneo, embora a espécie também seja cultivada nas Ilhas Canárias (Espanha), no Oceano Atlântico, em Eilat (Israel), no Mar Vermelho, no Golfo Pérsico e no Mar da Arábia (Basurco *et al.*, 2011). Na composição dos produtos de aquacultura da União Europeia, por volume, no ano de 2011, a dourada representou 6% da composição total, sendo este valor inferior aos valores de mexilhão, truta, salmão e ostras mas superior aos de espécies como carpa, robalo, amêijoa e pregado (EC, 2014).

1.3 Qualidade dos produtos de aquacultura

O peixe e os produtos da pesca desempenham um papel fundamental na segurança alimentar e nutricional, combate à pobreza e bem-estar (FAO, 2014). A carência em micronutrientes afecta centenas de milhões de pessoas, especialmente mulheres e crianças nos países em desenvolvimento, contudo o peixe e os produtos de pesca são a maior fonte de alimentação e de nutrientes essenciais para algumas populações (FAO, 2014). O consumo de peixe fornece energia, proteína e uma gama de nutrientes essenciais, que em muitos casos, pode até não haver fontes alimentares alternativas acessíveis para muitos destes nutrientes essenciais (FAO, 2014). Além disso, os alimentos provenientes do meio aquático têm ainda um papel especial como fonte de ácidos gordos polinsaturados n-3 de cadeia longa (n-3 LCPUFAs), ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA) (FAO, 2014).

Grigorakis (2011) apresenta um conjunto de factores que definem a qualidade do peixe, designadamente:

- 1) Aspecto externo (cor, malformações, e ferimentos), forma e tamanho;
- 2) valor nutricional;
- 3) deposição de gordura;
- 4) características organolépticas (odor, sabor e textura);
- 5) frescura;
- 6) rendimento do filete.

Sob condições de cultivo, as características de qualidade dos peixes, tais como composição em ácidos gordos e concentração de vários nutrientes são conhecidos por serem influenciados pela composição da dieta (Ribeiro *et al.*, 2015). Contudo é muitas vezes difícil traçar a forma em como a alimentação afecta a qualidade, devido a esta ser afectada simultaneamente por factores endógenos (tamanho, sexo, fase do ciclo de vida e factores genéticos) e exógenos (alimentação, temperatura, salinidade, fontes externas de stress, exercício físico realizado pelo peixe e a densidade da população de peixes) (Grigorakis, 2011).

A frescura tem uma importante contribuição para a qualidade do peixe ou produtos da pesca e pode ser explicada, até certo ponto por parâmetros físicos, (bio) químicos, microbiológicos e sensoriais objectivos (Ólafsdóttir *et al.*, 1997).

Inicialmente, o consumidor julga um alimento a partir da sua cor e, só depois, a partir de outros atributos, tais como sabor e aroma (Wu & Sun, 2013). Normalmente, a decisão do consumidor em comprar o peixe tem como base a sua aparência visual (cor) (Wu & Sun, 2013).

1.3.1 Composição química do pescado

Actualmente a parte edível do peixe é o filete, logo a sua composição é o que define a qualidade do peixe (Grigorakis, 2011).

A composição química dos peixes difere bastante consoante a espécie e na mesma espécie também difere consoante a idade, sexo, estação do ano e ambiente. Os principais constituintes englobam as proteínas, lípidos, hidratos de carbono, cinza e água (Huss, 1995).

As proteínas no tecido muscular do peixe podem ser divididos em três grupos: as estruturais (actina, miosina, tropomiosin e actomiosina), que constituem 70-80% do

conteúdo total proteico; as sarcoplasmáticas (mioalbumina, globulina e enzimas) que constituem 25-30% e as do tecido conjuntivo (colagénio), que constituem cerca de 3% (Huss, 1995).

O teor de proteína no músculo não tem um papel tão importante como a gordura, contudo contribui para a qualidade das características organolépticas através da interação proteína-água (Grigorakis, 2011). Como regra geral, o pescado contém 17-25% de proteína bruta, com um teor médio de 19 g/100g (Nunes *et al.*, 2003).

A gordura pode ser designada de gordura hepática, muscular, perivisceral e peritoneal, consoante o local onde se deposita no peixe, sendo que as três últimas são importantes em termos de qualidade (Grigorakis, 2011). Normalmente, a deposição de gordura aumenta com o peso do peixe independentemente da alimentação, por exemplo peixes maiores tendem a ter um teor de lípidos mais elevado e Grigorakis & Alexis, (2005) já comprovaram que tal facto se verifica para a dourada (Grigorakis, 2011).

Para a dourada o nível óptimo de gordura na sua dieta é 15%, enquanto uma alimentação com 20% de lípidos aumenta significativamente a deposição de gordura (Grigorakis, 2011).

Os lípidos presentes nas espécies de peixes teleósteos podem ser divididos em dois grupos principais: os fosfolípidos e os triglicéridos. Os fosfolípidos compõem a membrana celular, sendo assim designados de lípidos estruturais, enquanto os triglicéridos são utilizados para o armazenamento de energia (Huss, 1995).

Os lípidos presentes na parte comestível do peixe são muito importantes pois afectam o sentido do gosto e a sensação de carne cozinhada na boca (Grigorakis, 2007). São compostos por uma larga variedade de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (consistem numa cadeia de átomos de carbono com um grupo carboxilo numa extremidade e um grupo metilo na outra extremidade) (Nunes *et al.*, 2003).

Os ácidos gordos insaturados consistem em monoinsaturados e polinsaturados e são alguns dos componentes estruturais importantes de peixes e algas e desempenham um papel importante na promoção da saúde do corpo humano. Os polinsaturados dividem-se em duas classes: n-3 e n-6, sendo que a distinção entre os ácidos gordos n-3 e n-6 se baseia na localização da primeira ligação dupla. Nos ácidos gordos n-3, a primeira ligação dupla encontra-se no terceiro átomo de carbono, enquanto que nos ácidos gordos n-6 a primeira ligação dupla ocorre no sexto átomo de carbono, a contar a partir da extremidade com o grupo metilo (Yu & Gu, 2013).

De entre os lípidos da dieta de peixes marinhos, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA), têm tido uma atenção considerável, particularmente o ácido docosahexanóico (22:6 n-3, DHA), o ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA) e o ácido araquidónico (20:4 n-6, AA) (Sargent *et al.*, 1997). Estes ácidos gordos têm um papel fisiológico importante no peixe como componentes de fosfolípidos da membrana e como precursores de eicosanóides biologicamente activos (Bell *et al.*, 1995). Os PUFA desempenham ainda funções importantes, tais como, regulação da arquitectura, dinâmica, fase de transição e permeabilidade da membrana e são os precursores de uma grande variedade de metabolitos que regulam funções biológicas fundamentais (Certik & Shimizu, 1999).

No entanto, devido ao seu elevado nível de insaturação, estes ácidos gordos são altamente sensíveis à oxidação, a qual é continuamente gerada no processo fisiológico da célula (Biesalski, 1992).

A quantidade de vitaminas e minerais é específico da espécie e pode, além disso, variar com a estação (Huss, 1995).

De um modo geral, o peixe é uma boa fonte de vitamina B, e, no caso de espécies gordas, também das vitaminas A e D (Huss, 1995). Com o propósito de proteger os ácidos gordos polinsaturados n-3, considerados de grande importância, a vitamina E pode ser adicionada à ração do peixe como um antioxidante (Huss, 1995).

Existem cerca de 20 elementos minerais inorgânicos que são consideradas como essenciais para a vida animal, incluindo os peixes. Os elementos minerais essenciais são geralmente classificadas em dois grupos principais de acordo com a sua concentração no corpo do animal: os macromelementos (minerais que são necessários em quantidades consideráveis) e os microelementos (minerais necessários em menores quantidades) (Tacon, 1987).

Os minerais são constituintes essenciais do exoesqueleto, desempenham um papel fundamental na manutenção da pressão osmótica, servem como constituintes estruturais dos tecidos moles, desempenham um papel vital no equilíbrio ácido-base do corpo e são essenciais para a transmissão de impulsos nervosos e contracção muscular. Os minerais servem ainda como componentes essenciais para as enzimas, vitaminas, hormonas, pigmentos respiratórios, ou como cofactores no metabolismo, catalisadores e activadores enzimáticos (Tacon, 1987; Watanabe *et al.*, 1997).

Os peixes conseguem absorver parte dos seus requisitos minerais da água circundante através das brânquias e da dieta (Tacon, 1987; Watanabe *et al.*, 1997).

A nível mineral, o peixe é considerado principalmente como uma fonte valiosa de cálcio e fósforo, mas também de ferro, cobre e selénio. Em peixes de aquacultura, o conteúdo de vitaminas e minerais é o reflexo dos componentes que integram a alimentação dos peixes (Huss, 1995).

1.3.2 Alterações na qualidade

1.3.2.1 Oxidação lipídica

Os processos de oxidação lipídica, que ocorrem durante o armazenamento de alimentos causam mudanças importantes nas suas propriedades sensoriais, tais como rancificação, que está relacionada com o desenvolvimento de sabores estranhos e deterioração da cor (Álvarez *et al.*, 2012). No caso do pescado, o teor elevado de ácidos gordos polinsaturados torna-o muito susceptível à oxidação lipídica durante o armazenamento (Fraser & Sumar, 1998). A oxidação lipídica é um processo complexo em que os ácidos gordos insaturados são atacados por radicais, resultando em radicais que rapidamente reagem com o oxigénio conduzindo a hidroperóxidos lipídicos (Frankel, 1998). Numa fase posterior, os produtos de oxidação formados podem reagir com outros componentes do músculo, tais como proteínas, aminoácidos ou vitaminas, levando a alterações na cor ou na textura do peixe (Kanner, 1994). O grau de oxidação lipídica em peixes refrigerados e congelados depende da espécie de peixe, do tipo muscular, da presença ou ausência de activadores e inibidores (iões metálicos, enzimas oxidativas, carotenóides) (Undeland *et al.*, 1998). Desta forma conhecer os factores que influenciam a taxa e extensão da reacção é essencial para projectar estratégias para inibir/retardar a oxidação lipídica (Medina *et al.*, 2009). A oxidação lipídica deve ser inibida para garantir a óptima qualidade e manter os valores sensoriais e nutricionais durante o armazenamento e processamento dos peixes (Medina *et al.*, 2009). Hoje em dia, explorar novos antioxidantes naturais tem surgido como uma metodologia eficaz e rentável para a estabilização dos produtos de peixe ou dos produtos ricos em n-3 PUFA (Medina *et al.*, 2009).

1.3.3 Métodos de avaliação da qualidade do pescado

1.3.3.1 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial é definida como a disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar características dos alimentos percebidas pelos sentidos da visão, olfacto, paladar, tato e audição (Ólafsdóttir *et al.*, 1997).

Os métodos sensoriais, em oposição aos não-sensoriais, oferecem a melhor oportunidade de obter uma ideia válida daquilo que o consumidor pretende, pois estes métodos fornecem informações imediatas de qualidade (Connell, 1975). Mesmo quando são utilizados métodos químicos e físicos para avaliar a qualidade do peixe, a avaliação sensorial deve ser realizada para garantir que os resultados estão de acordo com os testes instrumentais (Alasalvar *et al.*, 2001).

Os procedimentos de preparação e apresentação das amostras são etapas cruciais e devem ser padronizados segundo o tipo, a espécie ou a variedade de produto (Zenebon *et al.*, 2008). Recomendam-se inúmeros procedimentos, dos quais fazem parte:

- A amostra deve ser representativa.
- As amostras devem ser preparadas de forma idêntica. Para todas as unidades de amostras, a porção, a quantidade, o formato e o tamanho (espessura) devem ser controlados segundo as características do produto.
- As amostras devem ser servidas em recipientes próprios ou os comumente utilizados nas refeições de indivíduos. Podem utilizar-se talheres, guardanapos e vasilhames para descartar os resíduos. Todos os recipientes devem estar bem limpos, secos e livres de odores estranhos.
- Antes da apresentação da amostra deve verificar-se e controlar a temperatura, pois é um importante factor de variação na percepção do odor e do sabor.
- As condições ambientais devem ser controladas antes da análise sensorial tendo em consideração a utilização de cabines individuais, o grau de luminosidade, temperatura climatizada adequada, ausência de ruídos e odores estranhos.

Na escolha de indivíduos que irão formar a equipa sensorial, deve ter-se em consideração alguns requisitos (Zenebon *et al.*, 2008), tais como:

- Cada membro da equipa deve revelar interesse, disponibilidade, pontualidade e vontade de avaliar grande parte das categorias de produtos nos dias marcados para teste, selecção e treino previamente agendados.
- O candidato deve revelar boa forma de expressão, habilidade verbal e vocabulário próprio que possa definir e descrever adequadamente os atributos sensoriais.

- O candidato deve apresentar boas condições de saúde, ausência de gripes e alergias.
- Devem-se evitar candidatos fumadores.
- Deve avaliar-se a acuidade sensorial e o poder de discriminação para cores, textura, odores e gostos primários. Ficar atento nos casos de ocorrência de anomalias nos órgãos da visão, olfacto, audição e paladar. A faixa etária recomendável situa-se entre 18 a 50 anos, pois, após esta idade o indivíduo pode revelar certa dessensibilização dos órgãos sensores.

Os testes sensoriais dividem-se em três grupos: testes discriminativos; testes descritivos e testes afectivos (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). O teste discriminativo e descritivo são testes analíticos objectivos em que se utiliza um painel treinado e os testes afectivos são testes subjectivos que se baseiam numa medida de preferência ou aceitação (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). O teste discriminativo é utilizado para determinar se existe uma diferença entre as amostras, enquanto os testes descritivos são utilizados para determinar a natureza e a intensidade das diferenças (Huss, 1995). Nos testes descritivos o método da análise descritiva quantitativa (ADQ) é muito utilizado para traçar, da forma mais completa possível, o perfil sensorial quanto aos atributos de aparência, odor, textura e sabor, sendo as escalas não estruturadas as mais empregadas (Zenebon *et al.*, 2008). A escolha do método depende da finalidade da aplicação da avaliação sensorial e se é usado no desenvolvimento de um produto, no controlo de qualidade, estudos de consumo ou de pesquisa (Ólafsdóttir *et al.*, 1997).

1.3.3.2 Determinação instrumental da cor

A cor, largamente utilizada na indústria alimentar, é um factor de apelo bastante importante, um enorme critério de identificação, um indicador de qualidade e frescura e é determinante na aceitabilidade do consumidor, imagem e valor de mercado (Gouveia *et al.*, 2007). Os produtos de aquacultura de alta qualidade devem cumprir vários requisitos bem apreciados pelos consumidores, incluindo a cor adequada, que está entre os mais importantes parâmetros de qualidade de peixe no mercado. A cor é a primeira característica a ser percebida e é um critério de selecção determinante, directamente relacionada com a subsequente aceitação ou rejeição (Shahidi *et al.*, 1998). Os consumidores subconscientemente relacionam a cor do produto ao valor nutritivo,

salubridade, frescura e sabor, por isso, a cor é um critério de qualidade decisivo que tem que ser mantido e aperfeiçoado (García-Chavarría & Lara-flores, 2013).

O sistema mais popular para a medição instrumental da cor nos alimentos é o sistema CIE 1976 L^* a^* b^* , recomendado pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE). Neste sistema o L^* representa luminosidade, que varia de 0 a 100 ($L^* = 0 \rightarrow$ preto; $L^* = 100 \rightarrow$ branco/luminoso), o a^* reflecte a dimensão verde/vermelho ($a^* < 0$ significa intensidade no verde e $a^* > 0$ significa intensidade no vermelho) e o b^* a dimensão azul/amarelo ($b^* < 0$ significa intensidade no azul e $b^* > 0$ significa intensidade no amarelo) (Botta, 1995). De acordo com o conceito da CIE (1978), cor é uma característica tridimensional da aparência que consiste do atributo da luminosidade (L^*) e dois atributos cromáticas, ou seja, *hue* e *croma*.

1.4 Dieta: influência na qualidade do pescado; alternativa à farinha e óleo de peixe; factor apelativo (como ingrediente funcional)

A dieta deve fornecer todos os nutrientes essenciais e energia em sintonia com as necessidades do animal para a manutenção das funções fisiológicas vitais, tais como crescimento, reprodução e saúde. Além disso, em aquacultura tal como em outros sistemas de produção animal, outro aspecto importante é o de garantir a qualidade da carne e a qualidade ambiental, ambos relacionados com a nutrição (Kaushik, 2000).

As rações formuladas para peixes carnívoros, contêm tradicionalmente elevadas proporções de ingredientes derivados de recursos marinhos (Bendiksen *et al.*, 2011). As farinhas de peixe (FM) e óleos de peixe (FO) a partir de pequenos pelágicos marinhos têm sido ingredientes de escolha, devido à combinação favorável entre qualidade nutricional e preço (Bendiksen *et al.*, 2011). As FM são caracterizadas pelo seu elevado teor de proteínas, um bom equilíbrio de aminoácidos e uma digestibilidade de nutrientes alta, enquanto os FO marinhos são uma excelente fonte de ácidos gordos essenciais da família n-3, e as rações que contêm estes ingredientes são facilmente aceites por uma vasta variedade de espécies de peixes carnívoros (Hertrampf & Piedad-Pascual, 2000; Houlihan *et al.*, 2001; Halver & Hardy, 2002; Miller *et al.*, 2008).

Para além do sector da aquacultura actualmente consumir cerca de 75% da produção mundial de FO (FAO, 2014), a maioria das reservas mundiais de peixes marinhos pelágicos são consideradas sobre-exploradas (FAO, 2009), de modo que o crescimento

da produção aquícola exigirá dependência reduzida sobre FMs e FOs obtidos directamente a partir destas fontes, com consequente aumento do uso de ingredientes de alimentos alternativos.

O sector de rações formuladas para meio aquático deve encontrar a forma mais sustentável de equilibrar as demandas de modo a reduzir a dependência de ingredientes derivados de recursos marinhos finitos, mantendo o desempenho do crescimento e os elevados padrões de qualidade dos produtos para os consumidores (Ramalho *et al.*, 2014). Nas últimas décadas foram feitos esforços significativos com o intuito de encontrar ingredientes alternativos rentáveis (Ramalho *et al.*, 2014). Para além do papel que as microalgas desempenham como parte do alimento vivo da cadeia trófica na alimentação de larvas de peixes, há actualmente um esforço no sentido de explorar as microalgas em rações para peixes (Ramalho *et al.*, 2014). A produção de biomassa algal à escala comercial pode ser uma alternativa viável para a FM e FO na aquacultura (Taelman *et al.*, 2013), o que reduziria tanto o custo como o impacto ecológico da aquacultura intensiva (Muller-Feuga, 2000). A biomassa de microalgas pode ter também um grande potencial no sector da alimentação animal como um ingrediente funcional (ou seja, produtos incorporados na alimentação que transmitem um benefício acima e para além de satisfazer as necessidades básicas nutricionais (Diplock *et al.*, 1999; Ramalho *et al.*, 2014).

1.5 Microalgas

As microalgas compreendem um vasto grupo de organismos fotossintéticos heterotróficos, que são classificados de acordo com vários aspectos, tais como estrutura da célula e pigmentos e substâncias que armazenam (Cerezuela *et al.*, 2012). Ao serem organismos fototróficos estão expostos a quantidades elevadas de oxigénio e ao stress de radicais, o que tem resultado no desenvolvimento de numerosos sistemas contra a oxidação e stress radical (Pulz & Gross, 2004). Assim, estes mecanismos protectores têm a capacidade de prevenir a acumulação de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio, combatendo desta forma as actividades que danificam as células (Pulz & Gross, 2004).

A biomassa microalgal é uma fonte natural da maioria dos compostos biologicamente activos ilimitados, tais como carotenóides, ficobilinas, ácidos gordos, polissacarídeos, vitaminas e esteróis (Gouveia *et al.*, 2007). Além disso, as microalgas podem ter

estabilidade lipídica superior, em comparação com os tradicionais PUFAs, pois são naturalmente ricas em antioxidantes, carotenóides e vitaminas, e também porque os lípidos estão bioencapsulados pela parede celular da alga (Patil *et al.*, 2007).

Apesar das diferenças que existem na composição das microalgas, pois varia entre classes e até entre espécies, a proteína (12-35%, peso seco) é sempre o maior constituinte orgânico, seguido normalmente por lipídios (7,2-23%, peso seco) e hidratos de carbono (4,6-23%, peso seco) (Becker, 2004). O teor de proteína e de vitamina são um factor determinante no valor nutricional das microalgas, mas para além disso, o teor em PUFAs, por exemplo, EPA, AA e DHA é de grande relevância (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

As diatomáceas (Bacillariophyceae) representam um importante grupo de microalgas eucarióticas encontradas em habitat terrestre húmido, marinho e de água doce (Domergue *et al.*, 2003). Pertencem ao grupo heterocontes devido ao comprimento desigual dos seus flagelos, característico deste grupo, apesar de na sua fase vegetativa não possuírem flagelos, são ainda facilmente reconhecidas devido à sua cobertura celular que consiste em duas válvulas de sílica (Pulz & Gross, 2004). São unicelulares planctónicas e os plastídios destas diatomáceas contêm xantofilas como fucoxantina (Fxn) que são os principais pigmentos acessórios para a fotossíntese e que são os responsáveis pela cor acastanhada destes organismos (Bhaya & Grossman, 1991; Bertrand, 2010).

As principais aplicações das microalgas na aquacultura são associadas à nutrição, coloração e indução de outras actividades biológicas (Hemaiswarya *et al.*, 2011). Estas diversas aplicações das microalgas no ramo da aquacultura devem-se ao elevado teor proteico; à capacidade de sintetizar todos os aminoácidos; à presença de hidratos de carbono compostos por amido, glucose e açúcares e polissacarídeos não digeríveis (agar, carragenina e alginato); aos lípidos, sob a forma de glicerol e ácidos gordos (famílias n-3 e n-6); e ao conteúdo valioso de muitas vitaminas essenciais (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico (vitamina B5)), minerais (fósforo, zinco, ferro, cálcio, selénio, magnésio), substâncias antioxidantes e carotenóides (Duerr *et al.*, 1998; Amar *et al.*, 2004; Ramalho *et al.*, 2014). Ainda, os alimentos utilizados na aquacultura que dependem do uso de biomassa de microalgas também poderiam beneficiar da imagem sustentável e natural que estes ingredientes apresentam (Ramalho *et al.*, 2014), bem como do facto de serem um recurso não

limitado que pode ser produzido em quantidades industriais sob condições ambientais seguras (Harel *et al.*, 2002).

1.5.1 *Phaeodactylum tricornutum*

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* é uma das duas diatomáceas cujo genoma (27,4 Mb) está sequenciado (Bowler *et al.*, 2008). Esta análise indica que estes organismos têm determinadas vias metabólicas e outras características únicas que podem explicar em parte a sua adaptação extraordinária para uma vasta gama de habitats e condições ambientais (De Riso *et al.*, 2009). Ao contrário de outras diatomáceas, *P. tricornutum* é muito pobre em sílica e a sua parede celular é caracterizada por possuir quase exclusivamente componentes orgânicos: principalmente polissacarídeos, proteínas e uma pequena quantidade de lípidos (Francius *et al.*, 2008). Esta espécie contém em média, em base seca, 36,4% de proteína bruta, 26,1 % de hidratos de carbono, 18,0% de lípidos, 15,9% de cinza e 0,25% de fibra (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

1.5.1.1 *P. tricornutum* como fonte de PUFA

A diatomácea *P. tricornutum* é uma microalga unicelular muito interessante como fonte de lípidos dado que utiliza os lípidos como principal produto de armazenamento (Reis *et al.*, 1996; Mirón *et al.*, 2002), produzindo grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados, incluindo uma quantidade considerável de EPA (Arao *et al.*, 1987; Dunstan *et al.*, 1994; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001; Cerezuela *et al.*, 2012). Esta quantidade relativamente elevada de EPA deve-se à elevada taxa de crescimento máxima específica que se encontra entre os 0,06 e 0,09 h⁻¹ (Siron *et al.*, 1989). Na microalga *P. tricornutum* 8 a 10% da constituição da biomassa algal são ácidos gordos, em que o EPA constitui entre 27 a 30% de todos os ácidos gordos presentes (Figura 1.5) (Atalah *et al.*, 2007) podendo chegar até aos 40% (Pérez-López *et al.*, 2014). Do perfil de ácidos gordos da espécie *P. tricornutum* fazem ainda parte maioritariamente o ácido palmítoleico (POA) (16:1^{Δ9}; 26%), o ácido palmítico (16:0; 17%), o ácido hexadecatrienóico (16:3^{Δ6,9,12}; 10%) e o ácido mirístico (14:0; 5%) (Figura 1.4) (Domergue *et al.*, 2003).

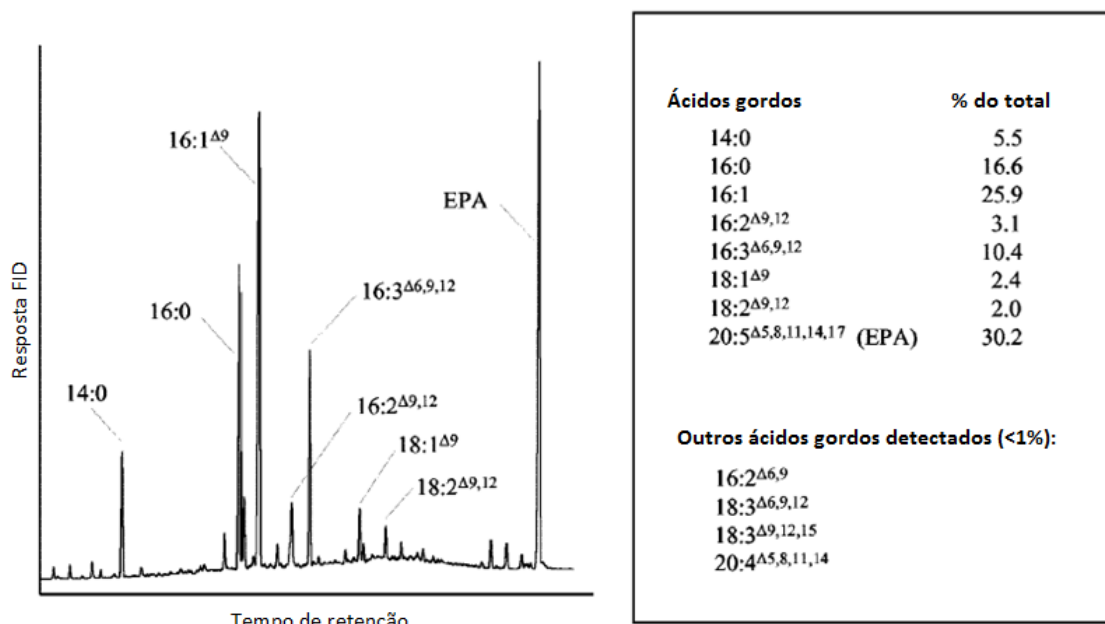


Figura 1.4 - Composição do perfil de ácidos gordos da espécie *P. tricornerutum* (adaptado Domergue *et al.*, 2003).

1.5.1.2 *P. tricornerutum* como fonte de carotenóides

Tendo em conta os efeitos de deterioração sobre o ambiente, devido à utilização de pigmentos sintéticos, os investigadores estão a dar cada vez mais ênfase à necessidade de utilizar pigmentos naturais como meio de coloração, tornando-se uma alternativa viável aos produtos químicos sintéticos (García-Chavarría & Lara-flores, 2013).

Estima-se que a produção natural anual de carotenóides é cerca de 100 milhões de toneladas, sendo que a fucoxantina é um dos carotenóides mais abundantes, e contribui com mais de 10% (10 milhões de toneladas) da produção total estimada de carotenóides na natureza, especialmente no ambiente marinho (Dembitsky & Maoka, 2007).

A Fxn é um pigmento de cor laranja, que tem também presente clorofila a, c e β-caroteno (Bharathiraja *et al.*, 2013). A Fxn tem uma ligação alénica, pouco usual e alguns grupos funcionais oxigénicos, tais como epoxi, hidroxilo, carbonilo e porções carboxilo na sua molécula (Figura 1.5) que contribuem para a sua estrutura única (Nomura *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999). Esta ligação alénica é também a responsável por uma função antioxidante mais elevada (Sachindra *et al.*, 2007). A Fxn é um carotenóide lipossolúvel vulnerável à oxidação e degradação quando exposto à luz, calor e condições ácidas ou alcalinas (Siew-Ling *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2011).

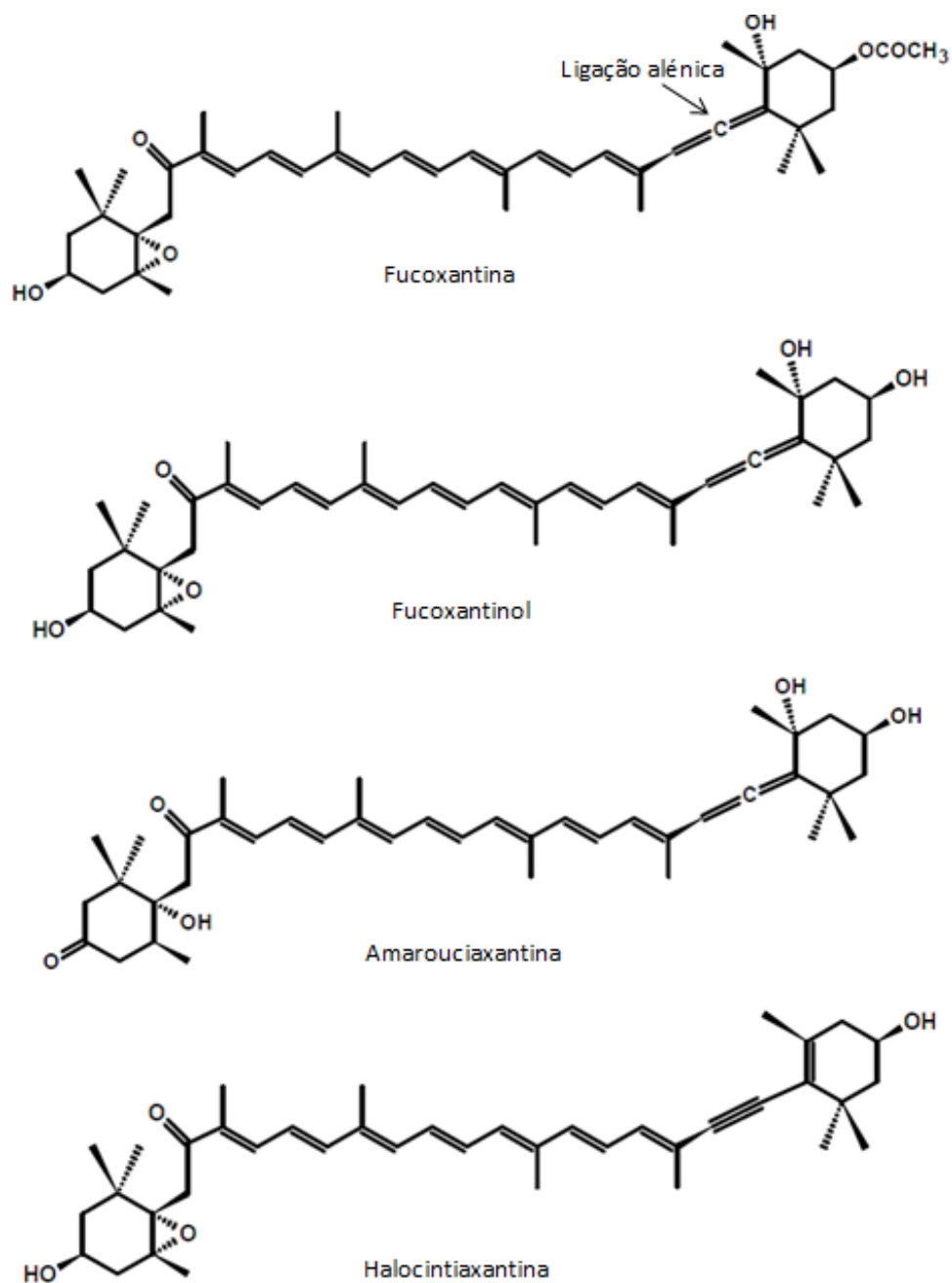


Figura 1.5 - Estrutura da fucoxantina e dos seus metabolitos (adaptado Peng *et al.*, 2011).

A microalga *P. tricornutum* é uma diatomácea rica em, fucoxantina, caroteno e clorofila a e c (Cerezuela *et al.*, 2012) sendo a Fxn o seu principal carotenóide (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - Classes e teores relativos dos carotenóides presentes na microalga *P. tricorutum* (adaptado, Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

Estado	Estacionário* Fucoxantina	Violaxantina	Diadinoxantina	Anteraxantina	Diatoxantina	Zeaxantina	β, β-Caroteno	β, ε-Caroteno
RI.3d	65.8	0.23	2.66	22.2	3.17	1.74	2.12	0.24
RI.2d	62.9	0.24	1.32	27.9	2.72	0.91	3.18	0.19
RI.1d	60.8	0.13	0.17	8.27	9.75	6.54	12.7	0.15
RI.2b	51.8	0.14	13.2	6.87	5.62	2.33	19.3	0.09

* Os códigos são explicados nas Tabelas 1-3 em Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001.

1.6 Carotenóides: função dos carotenóides; utilização em aquacultura

A cor da pele dos peixes depende inicialmente da presença de cromatóforos, contendo pigmentos como melaninas, carotenóides, pteridinas e purinas (Chatzifotis *et al.*, 2005), e depende também da absorção e deposição dos pigmentos carotenóides da dieta, uma vez que os peixes, tal como outros vertebrados, são incapazes de sintetizar carotenóides *de novo* (Goodwin, 1984).

A maioria dos peixes acumula os carotenóides no seu tegumento e gónadas. Os carotenóides no tegumento podem contribuir para fotoproteção, camuflagem, e sinalização, enquanto ao nível das gónadas eles assumem um papel essencial na reprodução dos animais marinhos (Maoka, 2011). Excepto para o peixe-gato, os carotenóides acumulados no tegumento do peixe existem na sua forma esterificada (Maoka, 2011). É bem conhecido que os carotenóides têm um grupo final β, não substituído, tal como β-caroteno, α-caroteno, e β-criptoxantina, que é precursor de vitamina A nos animais (Maoka, 2011).

Os peixes selvagens obtêm a maioria dos seus carotenóides alimentando-se de pequenos crustáceos e outros invertebrados (Gomes *et al.*, 2002). No entanto, em condições de cultivo intensivo, onde os peixes normalmente são privados das suas fontes naturais de alimentos, e tendo em conta que as dietas artificiais geralmente não possuem as fontes naturais de pigmentos que dão a alguns organismos, como por exemplo a truta e o salmão a sua coloração característica (Apt & Behrens, 1999), devem ser adicionados à sua dieta carotenóides que vão desempenhar um papel importante na regulação da cor da pele e/ou músculo do peixe (Chatzifotis *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2005, 2007).

O padrão de pigmentação da pele pode ser considerado como um índice de bem-estar animal em espécies de aquacultura e um factor de consideração económica (Pavlidis *et al.*, 2006). A pigmentação adequada da pele constitui em determinadas espécies, como por exemplo, na dourada um parâmetro importante de qualidade pois melhora a

aparência do peixe, o que conseqüentemente é associado a frescura e a diferenciação do produto pelo consumidor (Kalinowski *et al.*, 2007). Os pigmentos são responsáveis pelo amplo espectro de cores em peixes, que é um pré-requisito essencial para a qualidade à medida que procuram um preço mais elevado no mercado comercial (García-Chavarría & Lara-flores, 2013).

O papel dos carotenóides tem sido associado não só com a pigmentação, mas também com outras funções fisiológicas, como função antioxidante elevada, que minimiza ou previne a oxidação lipídica dos produtos alimentares, mantendo assim a qualidade nutricional dos mesmos (Shahidi *et al.*, 1998; Gouveia & Empis, 2003; Chatzifotis *et al.*, 2005; Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Maoka, 2011). Os carotenóides têm ainda influência na reprodução, estabilidade de proteínas e fotoproteção e são também uma fonte de vitamina A e minerais (Shahidi *et al.*, 1998; Gouveia & Empis, 2003). Apesar da importância dos carotenóides, estes compostos são muito instáveis e a sua degradação oxidativa pode ser desencadeada pela luz, pH extremo ou temperatura, na presença de oxigénio (Gouveia & Empis, 2003).

1.7 Objectivos

A dourada (*Sparus aurata*) é uma espécie de elevado valor na região do Mediterrâneo e muito apreciada devido ao seu aroma e qualidade. Contudo o mercado desta espécie, pela forma como é comercializada encontra-se saturado e por isso é necessário inovar na forma como o produto é apresentado ao consumidor, não perdendo do foco o factor qualidade. Assim, investigar novas formas/estratégias que possam atribuir à dourada alguma característica que a torne mais apelativa ao consumidor é uma das metas a atingir no cultivo desta espécie. Os consumidores preferem douradas cujo opérculo e banda interorbital tenham uma pigmentação dourada mais saliente, já que associam esta característica com os indivíduos capturados pela pesca. As microalgas, fontes naturais de carotenóides podem promover esta coloração, tendo assim um elevado potencial para serem usadas como ingredientes funcionais.

Assim, o presente trabalho teve como principal objectivo investigar o efeito da incorporação de 2,5 % de biomassa da microalga *Phaedactylum tricorutum* (estirpe selvagem e geneticamente modificada), em rações de acabamento, na pigmentação da pele de dourada (*S. aurata*), em particular no opérculo e na banda interorbital.

Pretende-se também avaliar de que forma esta incorporação poderia afectar outros atributos da qualidade, designadamente as propriedades sensoriais e valor nutricional.

2. Material e Métodos

2.1 Material biológico

As quarenta e oito douradas utilizadas no trabalho foram provenientes de três tratamentos diferentes e foram fornecidas pela empresa SPAROS Lda., no âmbito de um estudo de inclusão da microalga *Phaedactylum tricornutum* em rações para dourada, cuja coordenação científica esteve a cargo da empresa acima referida. As douradas com um peso médio inicial de 233 ± 13 g foram colocadas em tanques circulares de 1000 L (Figura 2.1) nas instalações do CCMAR - Estação Marinha do Ramalhete, localizada junto a um dos principais canais da Ria Formosa. Os peixes foram alimentados à mão, três vezes por dia (09:30h, 14:30h e 16:30h), durante os dias de semana, uma vez por dia ao sábado e não alimentados aos domingos. A água do mar foi fornecida aos tanques (temperatura da água 22 – 27 °C, com variação natural durante os meses de Verão), por um sistema de fluxo contínuo. Os parâmetros de qualidade da água (oxigénio, salinidade (35ppm) e amónia) foram monitorizados diariamente e mantidos dentro dos limites para o crescimento óptimo da espécie. Os tanques de cultivo foram submetidos a fotoperíodo natural.



Figura 2.1 – Tanques circulares de 1000 L onde se procedeu ao cultivo da espécie *S. aurata*.

As dietas experimentais, formuladas e preparadas pela SPAROS Lda., foram testadas em duplicado ao longo de um período de 84 dias. A dieta controlo (CTRL) foi formulada como uma dieta comercial para douradas, com farinha de peixe a representar 30% da fonte proteica e óleo de peixe a representar 75% da fonte de óleo. Com base nesta formulação foram preparadas duas dietas adicionais:

Dieta MA20 - incorporando 2,5% de biomassa de uma estirpe selvagem da microalga *P. tricornutum*;

Dieta MA37 – incorporando 2,5% de biomassa de uma estirpe geneticamente modificada de *P. tricornutum*, neste caso, com níveis de fucoxantina potencialmente mais elevados.

A formulação e composição das dietas experimentais apresentam-se na Tabela 2.1. Todas as dietas extrusadas eram isoproteicas, isolipídicas e isoenergéticas.

Tabela 2.1 - Ingredientes e composição química aproximada das dietas experimentais usadas no cultivo das douradas.

Ingredientes, %	CTRL	MA20	MA37
Farinha de peixe LT 70	12,0	12,0	12,0
Farinha de peixe FAQ	18,0	18,0	18,0
Proteína de soja concentrada	5,0	5,0	5,0
Glúten de trigo	6,0	6,0	6,0
Glúten de milho	8,0	8,0	8,0
Farinha de soja	10,0	10,0	10,0
Farinha de colza	5,0	5,0	5,0
Trigo integral	7,0	5,0	5,0
Trigo: milho DDGS	3,0	5,0	5,0
Ervilhas integrais	9,8	7,3	7,3
Óleo de peixe	10,5	10,5	10,5
Óleo de palma	3,5	3,5	3,5
Vit & Min Premix ¹	1,0	1,0	1,0
Ligante	1,0	1,0	1,0
Antioxidante	0,2	0,2	0,2
Biomassa de microalga MA20 ²		2,5	2,5
Biomassa de microalga MA37 ³			
Matéria seca, % MS	96,9 ± 0,0	94,8 ± 0,1	94,6 ± 0,0
Proteína bruta, % MS	44,5 ± 0,3	45,4 ± 0,0	45,5 ± 0,4
Gordura bruta, % MS	18,6 ± 0,1	19,0 ± 0,2	18,6 ± 0,2
Cinza, % MS	9,9 ± 0,2	10,9 ± 0,1	10,7 ± 0,2
Fósforo total, % MS	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Energia bruta, kJ·g ⁻¹ MS	22,1 ± 0,0	22,4 ± 0,0	22,4 ± 0,0

¹Premix de vitaminas e minerais para peixes marinhos, PREMIX Lda, Portugal.

²Biomassa seca de uma estirpe selvagem de *Phaedactylum tricorutum*: 37,8% Proteína bruta (PB), 5,9% Gordura bruta (GB), A4F SA, Portugal.

³Biomassa seca de uma estirpe geneticamente modificada (GMO) de *P. tricorutum* com elevados níveis de fucoxantina: 37,6% PB, 5,4% GB, A4F SA, Portugal.

2.2 Amostragem

No final do ensaio, os peixes dos três tratamentos foram abatidos por imersão numa mistura de gelo-água salgada, numa proporção de 4:1. Após 30 min, recolheram-se 15 peixes de cada tratamento que foram acondicionados, com o abdómen para cima, em

caixas de poliestireno, cobertos com uma película de plástico sobre a qual se distribuiu gelo em escama. Os peixes foram entregues na Divisão de Aquacultura e Valorização (DivAV), do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.) em Lisboa, cerca de 18 h após o abate. As douradas foram de imediato colocadas em sacos que foram acondicionados em caixas de poliestireno e mantidos numa câmara a -20 °C, durante duas semanas.

O trabalho prático na DivAV iniciou-se com a descongelação das amostras, realizada sempre em câmara de refrigeração. Após a descongelação inicial de cinco peixes por tratamento, os peixes foram pesados, escamados e filetados. De cada peixe retirou-se um filete que foi imediatamente embalado em saco plástico e colocado a -20 °C, durante vinte e cinco semanas, para posterior determinação do grau de oxidação lipídica. O outro filete, após remoção da pele, foi cortado em pequenos pedaços e congelado a -80 °C para posterior liofilização, constituindo as amostras (cinco por tratamento) para realização das análises químicas e físicas no músculo.

Os restantes onze peixes foram pesados, escamados (apenas um dos lados) e filetados. De cada peixe, o filete escamado foi usado para avaliação sensorial enquanto que o filete com escama se destinou à determinação instrumental da cor (pele e músculo). Procedeu-se também à remoção dos dois opérculos e da banda interorbital em cada peixe, para medição da cor. Esta última fase teve a duração de cinco dias de trabalho, em que em cada dia foi analisado o mesmo número de peixes dos três tratamentos, previamente descongelados durante a noite em câmara de refrigeração.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Determinação instrumental da cor

Realizou-se a determinação da cor em diferentes zonas do corpo e da pele, conforme se ilustra na Figura 2.2. Na banda interorbital foram realizadas medições em três zonas bem distintas: duas junto aos olhos (B1 e B3) e uma na zona intermédia da banda (B3). No que respeita aos opérculos (OP), a determinação de cor realizou-se em ambos os opérculos de cada peixe, na zona correspondente à mancha pigmentada de amarelo. A determinação da cor no corpo (pele e músculo) realizou-se em três zonas distintas: zona dorsal (PD), zona dorsal intermédia (PDI), junto à linha lateral e zona ventral (PV).

Cada uma destas zonas foi cortada em quatro pedaços (por vezes três pedaços na zona ventral), realizando-se a medição de cor em cada um dos pedaços.

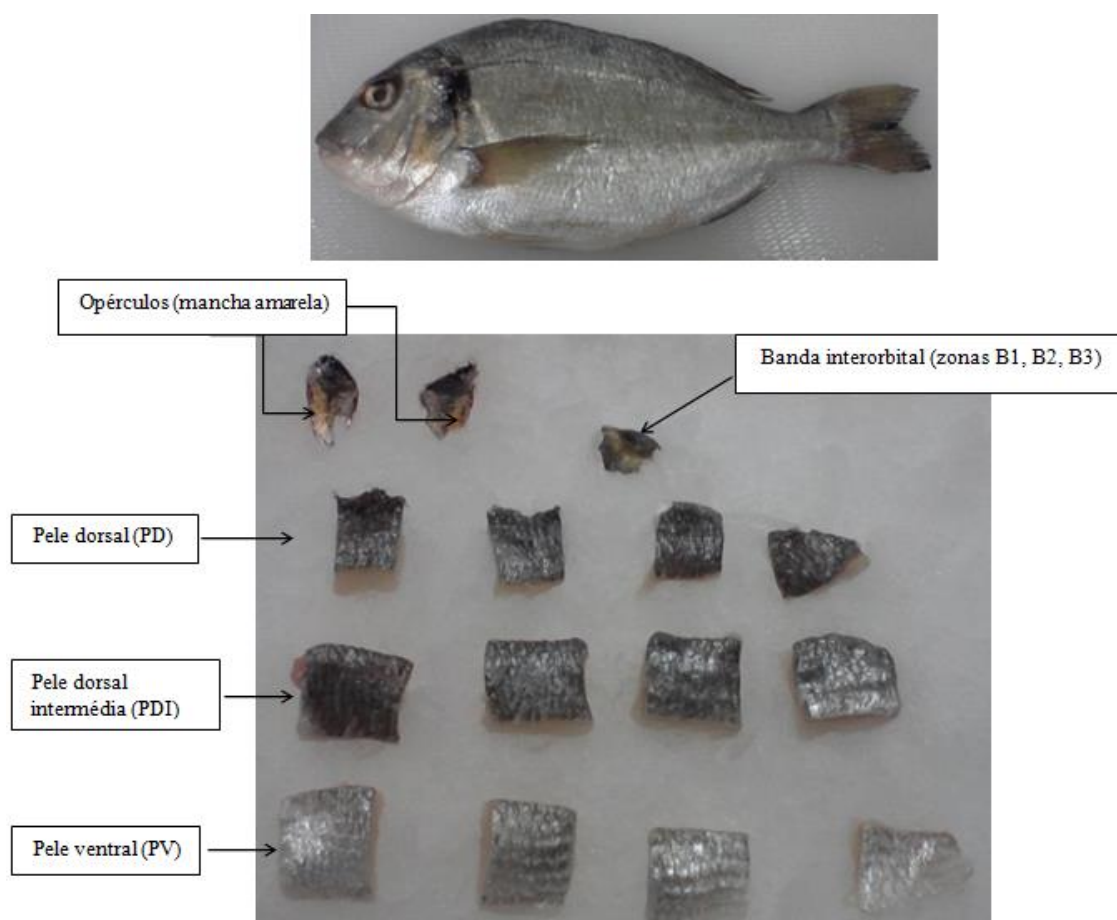


Figura 2.2 - Zonas do corpo de dourada utilizadas na determinação instrumental da cor da pele.

A determinação instrumental da cor foi realizada num colorímetro tristimulus (Macbeth Color-Eye 3000), obtendo-se as coordenadas L^* , a^* e b^* do sistema CIELAB (Figura 2.3) em que L^* representa luminosidade ($L^* = 0 \rightarrow$ preto; $L^* = 100 \rightarrow$ claro/luminoso "lightness"), o a^* reflecte a dimensão verde/vermelho ($a^* < 0$ significa intensidade no verde e $a^* > 0$ significa intensidade no vermelho) e o b^* a dimensão azul/amarelo ($b^* < 0$ significa intensidade no azul e $b^* > 0$ significa intensidade no amarelo). Utilizou-se um iluminante D65 e um observador padrão de 10° , diâmetro de 10 mm na área de medição. Antes de cada sessão de medição de cor o colorímetro foi calibrado com uma placa padrão de porcelana branca. Em cada uma das medições o resultado final para os parâmetros L^* , a^* e b^* correspondia ao valor médio de três medições consecutivas.

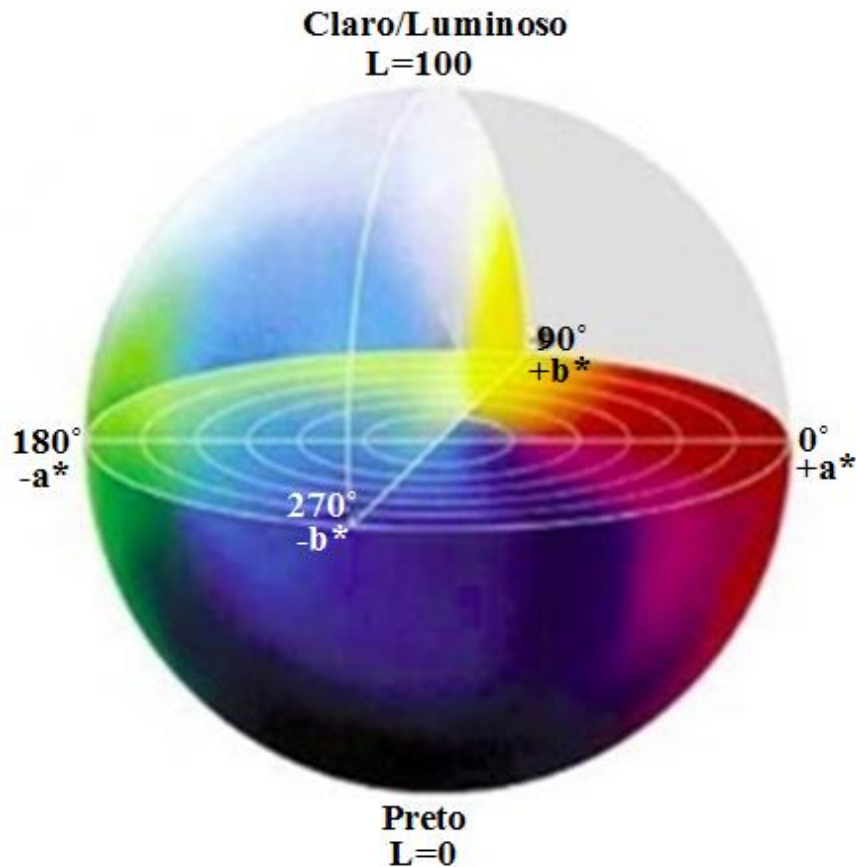


Figura 2.3 - Diagrama tridimensional do espaço de cor CIELAB. (Fonte: <http://infosign.net.br/gerenciamento-de-cores-para-impressoras-de-grande-formato/>).

Com as coordenadas de cor obtidas calculou-se o *hue* (H°), que indica a cor do produto, o cromatismo (C^*), que indica a saturação (intensidade) de cor e a brancura (W), através das seguintes fórmulas (Schubring, 2009), respectivamente:

$$H^\circ = \arctan(b^*/a^*)$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$W = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

2.3.2 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial decorreu numa sala climatizada, equipada com cinco gabinetes de prova individuais, iluminados com luz branca (Figura 2.4).



Figura 2.4 - Gabinete de prova para análise sensorial.

Para diminuir a variabilidade entre os filetes as partes caudal e junto à cabeça foram removidas, usando a zona dorsal de maior espessura de cada filete. Cada um destes pedaços de filete foi colocado num papelote de papel de alumínio e foram cozidos a vapor durante 10 min, num cozedor marca KENWOOD. Os filetes foram apresentados aos provadores de forma sequencial em pratos brancos codificados. Foram avaliados dez filetes de cada tratamento, distribuídos por duas sessões de prova independentes. Em cada sessão foram avaliados cinco filetes de cada tratamento por um painel de cinco provadores treinados, não fumadores, na faixa etária 34 a 50 anos. Os provadores avaliaram a intensidade dos atributos sensoriais, designadamente o cheiro, sabor e cor do filete utilizando uma escala linear não estruturada de 12 cm (Meilgaard, 1999), em que a extremidade esquerda da escala (0 cm) corresponde à “ausência do atributo” e a extremidade direita (12 cm) corresponde a “muito intenso” (Figura 2.5). Os resultados foram expressos em percentagem.



Figura 2.5 - Escala linear não estruturada usada na avaliação da intensidade dos atributos sensoriais.

2.3.3 Análises químicas e físicas no músculo

As análises químicas e físicas foram realizadas nos cinco filetes (por tratamento) liofilizados e moídos, numa picadora Moulinex para garantir uma boa homogeneização das amostras. As amostras foram conservadas a -80 °C até à realização das determinações analíticas.

No caso dos filetes embalados e congelados a -20 °C, para determinação do grau de oxidação lipídica, após vinte e cinco semanas foram descongelados apenas três filetes de cada tratamento. Após descongelação, removeu-se a pele a cada um dos filetes, cortaram-se em pequenos pedaços e colocaram-se em placas de petri a -20 °C para posterior liofilização. As amostras liofilizadas foram tratadas e conservadas até à realização da análise do modo indicado acima.

2.3.3.1 Composição química aproximada

Os teores de humidade, cinza e proteína bruta foram determinados de acordo com os métodos de referência descritos em AOAC (1998).

O teor de humidade foi determinado por gravimetria em 2 g de amostra, após 12 horas numa estufa a 105 °C, até obtenção de peso constante (Método AOAC 950.46). Determinou-se o teor de humidade da amostra através da fórmula:

$$\text{Humidade (\%)} = \left(\frac{m1 - m2}{m1 - m3} \right) * 100$$

em que: m1 = massa do cadinho com a amostra (g); m2 = massa do cadinho com a amostra após secagem (g); m3 = massa do cadinho (g).

O teor de cinza foi determinado por gravimetria após incineração da amostra (2 g), anteriormente seca em estufa a 105 °C, durante 12 horas, em mufla a 500 °C até obtenção de peso constante (Método AOAC 942.05). Determinou-se o teor de cinza da amostra através da fórmula:

$$\text{Cinza(\%)} = \left(\frac{m1 - m2}{m3 - m2} \right) * 100$$

em que: m1 = massa do cadinho com o resíduo de cinza (g); m2 = massa do cadinho (g); m3 = massa do cadinho com a massa da amostra húmida (g).

Para determinar o teor de proteína utilizou-se um equipamento da Marca LECO FP 528 que quantifica o azoto libertado por combustão (a 850 °C) na presença de oxigénio, com formação de óxido de azoto, com detecção do azoto por condutividade térmica (Método AOAC 992.15). O teor de proteína foi obtido através do produto do teor de azoto total pelo factor 6,25, usado na conversão de azoto em proteína, no caso de proteínas de origem animal (FAO, 2003).

Na determinação dos lípidos totais seguiu-se o método descrito em Folch *et al.*, (1957). Pesou-se aproximadamente 100 mg de amostra para um tubo de 15 ml e adicionou-se 3 ml de solução clorofórmio:metanol (CHCl₃:MeOH) (2:1), agitando-se num agitador vortex. Os tubos foram colocados num banho com agitação durante 10 min e de seguida adicionou-se 3 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1N e 300 µl de cloreto de magnésio (MgCl) a 0,5% (para precipitar as proteínas e facilitar a migração dos lípidos para a fase orgânica). Centrifugou-se a 2000 g durante 5 min para separação das fases aquosa e orgânica e recolheu-se toda a fase orgânica (parte inferior do tubo), usando uma pipeta *Pasteur*, para outro tubo de 15 ml, previamente tarado. Adicionou-se ao tubo com amostra mais 3 ml de solução CHCl₃:MeOH (2:1) e repetiu-se o processo incluindo a recolha da fase orgânica que se juntou à primeira recolha. Evaporou-se o solvente orgânico dos tubos sob atmosfera de azoto e findo este processo pesaram-se os tubos. A análise foi realizada em duplicado. O teor de lípidos totais da amostra determinou-se através da fórmula:

$$\text{Lípidos totais (\%)} = (a_1 * 100) / a_2$$

em que: a₁ = resíduo de gordura após evaporação (g); a₂ = toma de amostra (g).

Os resultados são apresentados em g/100 g músculo, em base seca (amostra liofilizada) e base húmida, após a aplicação do factor de conversão, calculado através da fórmula seguinte:

$$(100 - \% \text{ humidade na amostra fresca}) / (100 - \% \text{ humidade na amostra liofilizada}).$$

2.3.3.2 Determinação do perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado através da análise de metil ésteres, preparados de acordo com o método de Lepage & Roy (1986), modificado por Cohen *et al.*, (1988). A transmetilação dos ácidos gordos por catálise ácida realizou-se em 300 mg de amostra, em tubos de 15 ml, adicionando 5 ml da solução de cloreto de acetilo:metanol (1:19). A esterificação decorreu durante 1 h em banho de água a 80 °C e após arrefecimento adicionou-se à mistura 1 ml de água ultrapura (miliQ) e 2 ml de n-heptano. Centrifugou-se a 2000 g por 5 min e recolheu-se a fase orgânica, onde se encontram os ésteres metílicos, para um vial, filtrando-se por uma coluna de algodão, contendo sulfato de sódio anidro.

A separação e detecção dos ésteres metílicos foi efectuada pela injeção de 2 μ l num cromatógrafo de fase gasosa (Varian Star CP 3800 GC, Walnut Creek, CA), equipado com autoamostrador e um detector de ionização de chama (FID). A separação dos metil ésteres foi efectuada numa coluna de polietileno glicol capilar (DB-WAX, Folsom, CA) (30 m \times 0,25 mm de diâmetro interno, espessura da película: 0,25 μ m), utilizando hélio como gás de arraste, mantida à temperatura de 180 °C, durante 5 min, seguindo-se uma rampa de aquecimento de 4 °C/min, durante cerca de 10 min, até se atingir a temperatura de 220 °C, que foi mantida durante 25 min. Os compostos separados foram detectados no detector FID a 250 °C. A identificação dos ácidos gordos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com os padrões Sigma-Aldrich/Supelco PUFA No.1, Marine Source - Ref. 47033 e PUFA No.3, Menhaden oil - Ref. 47085-U. Os cromatogramas obtidos fornecem a percentagem relativa de cada ácido gordo presente na amostra (% do total de ácidos gordos).

Para expressão dos resultados em valor absoluto (mg/100 g de músculo) aplicou-se o factor correctivo para peixes ósseos, calculado segundo Weihrauch *et al.*, (1977), que oscila em função do teor de gordura presente na amostra, segundo a equação:

$$\text{Factor de conversão (peixes ósseos)} - \mathbf{F} = 0,933 - 0,143/\text{TL}$$

Onde: TL = Lípidos totais (%)

Este factor é utilizado na seguinte fórmula:

$$AG * F * (TL/100) * 1000$$

Onde: AG = % relativa do ácido gordo; F = factor de conversão; TL = % de lípidos totais na amostra (expressa em base húmida).

Os resultados da composição em ácidos gordos expressos em valor absoluto foram utilizados para calcular diversos indicadores da qualidade nutricional do músculo do peixe, tais como: o somatório de EPA e DHA, razão de ácidos gordos PUFA n-3/PUFA n-6 e os índices de trombogénicidade (TI) e aterogénicidade (AI), de acordo com Ulbricht & Southgate (1991):

$$AI = [12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0] / [PUFAn-6 + PUFAn-3 + MUFA]$$

$$TI = [14:0 + 16:0 + 18:0] / [(0,5 \times MUFA + 0,5 \times PUFAn-6 + 3 \times PUFAn-3) + (PUFAn-3/PUFAn-6)]$$

2.3.3.3 Determinação de elementos minerais e metálicos

A determinação de elementos minerais e metálicos, foi realizada de acordo com Carvalho *et al.*, (2005) utilizando a técnica de espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDXRF). O princípio do método consiste numa fonte de radiação X para ionizar os níveis internos dos átomos, por efeito fotoelétrico.

O espectrómetro de EDXRF utilizado consiste num tubo de raios-X equipado com um alvo secundário de molibdénio. A radiação característica emitida pelos elementos presentes na amostra foi detectada com um detector de sítio-lítio Si (Li), com uma janela de berílio de 8 μm e área de 30 mm^2 . A energia de resolução foi de 135 eV para 5,9 keV e o sistema de aquisição foi Nucleus PCA instalado num computador. O gerador de raios-X funcionou a 50 kV e 20 mA e o tempo de aquisição foi de 1000 s. Cada amostra foi comprimida em pastilhas de 2 cm de diâmetro com o auxílio de um bloco em aço para prensa da marca SPECAC (Figura 2.6 a) e com a prensa hidráulica (Figura 2.6 b), sem qualquer tratamento químico prévio. Para cada amostra foram feitas três pastilhas. Cada pastilha (Figura 2.7 a) foi colocada num suporte, colada a uma película *Mylar* (Figura 2.7 b), que foi posicionada diante do feixe de raios-X para a determinação dos elementos.

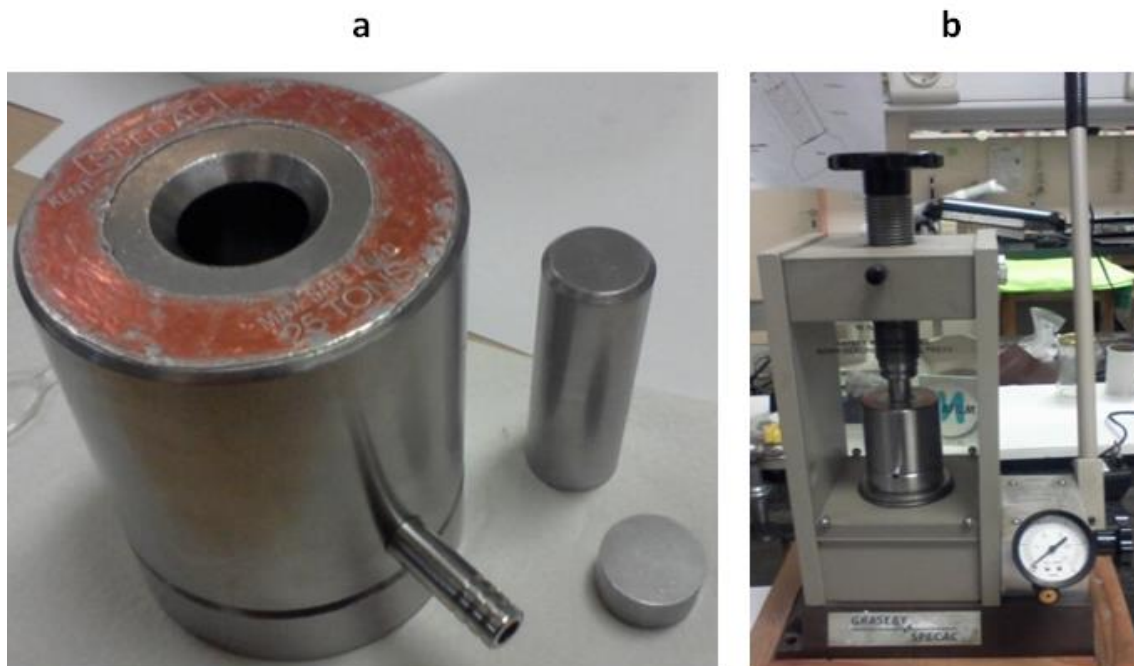


Figura 2.6 - a) Bloco em aço para prensa e **b)** prensa hidráulica.

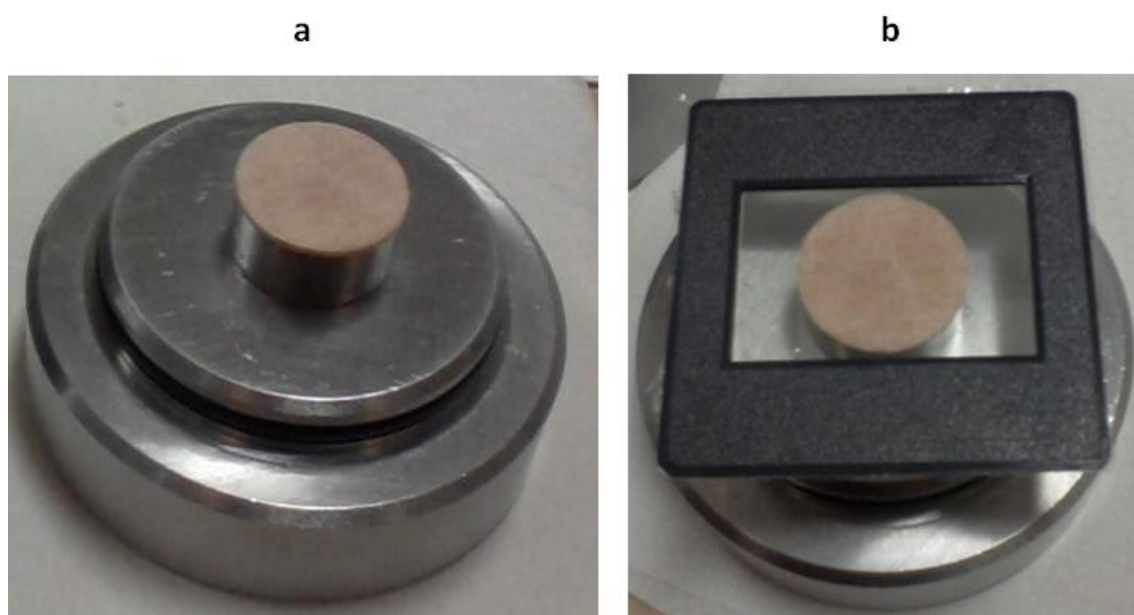


Figura 2.7 - a) Pastilha e **b)** preparação para determinação dos elementos.

2.3.3.4 Determinação do grau de oxidação lipídica

Determinou-se o nível de oxidação lipídica nas amostras ao início e após 25 semanas de congelação (-20 °C) através da composição em ácidos gordos, determinada pelo método descrito em 2.3.3.2, em particular o índice de polienos (PI). Este índice consiste na razão entre os ácidos gordos mais susceptíveis à oxidação, como é o caso dos ácidos

gordos polinsaturados, em especial os altamente insaturados, como o 20:5n-3 (EPA) e o 22:6n-3 (DHA) e os ácidos gordos mais estáveis como é o caso do 16:0, de acordo com a fórmula:

$$PI = (20:5n-3 + 22:6n-3)/16:0.$$

2.3.4 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em valor médio \pm desvio padrão (DP), excepto no caso do parâmetro *hue*. Testou-se os efeitos da inclusão da microalga nas dietas experimentais nos diferentes parâmetros de qualidade usando a análise de variância (ANOVA de uma via), excepto no caso da cor da banda interorbital, pele e músculo e do grau da oxidação lipídica, em que se recorreu à ANOVA factorial de duas vias. O teste de comparação múltipla utilizado foi o Tukey Test. Todos os testes foram realizados com IBM SPSS ver.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY). No caso da variável *hue*, por ser uma medida angular, foi aplicada estatística circular, mais concretamente uma ANOVA de uma via circular, para testar o efeito da dieta na pigmentação da pele, utilizando o software estatístico R (R Core Team, 2014) versão 3.0.3, com o pacote “circular” (Agostinelli & Lund, 2013). A comparação entre os grupos foi realizada com o teste Watson-Williams. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$ para todos os testes.

3. Resultados

3.1 Peso e rendimento do filete

Os peixes dos três grupos experimentais apresentavam um peso total de $400,1 \pm 35,5$; $388,2 \pm 36,2$ e $399,8 \pm 44,6$ para os grupos CTRL, MA20 e MA37 respectivamente, não se verificando diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os três tratamentos.

Os valores obtidos para o rendimento (filete) foram de $41,6 \pm 3,6$; $44,0 \pm 2,0$ e $44,7 \pm 2,5$ para os grupos CTRL, MA20 e MA37 respectivamente, sendo que, estas diferenças não se revelaram significativas ($P > 0,05$).

3.2 Cor

Os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) medidos para o opérculo de dourada encontram-se na Tabela 3.1, o *hue* (H°) e o croma (C^*) encontram-se representados nos gráficos das Figuras 3.1 e 3.2, respectivamente.

Tabela 3.1 - Parâmetros de cor em opérculo de dourada, alimentada com as dietas experimentais.

Parâmetros de cor	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
	CTRL	MA20	MA37
L^*	$74,8 \pm 3,7^a$	$79,8 \pm 3,2^b$	$79,9 \pm 2,7^b$
a^*	$0,2 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,8$
b^*	$5,3 \pm 0,9^a$	$6,5 \pm 1,1^{ab}$	$6,8 \pm 1,5^b$

Os valores correspondem à média \pm desvio padrão ($n=11$). O resultado final para cada peixe corresponde ao valor médio das determinações nos dois opérculos. Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). ¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *Phaeodactylum tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe geneticamente modificada (GMO).

A luminosidade (L^*) do opérculo de dourada foi afectada significativamente pela suplementação das dietas com as diferentes estirpes de microalga *P. tricornutum*, sendo que os grupos alimentados com as dietas MA20 e MA37 obtiveram valores de L^* significativamente diferentes dos obtidos para o grupo alimentado com a dieta controlo (CTRL) (Tabela 3.1). Não se observaram diferenças significativas para o parâmetro a^* entre os três grupos (aliás registou-se elevada variabilidade nos resultados, conforme é

visível pelo desvio padrão). Pelo contrário, registaram-se diferenças significativas no parâmetro b^* entre os grupos CTRL e MA37, enquanto que o grupo MA20 não se distinguiu significativamente de nenhum destes dois grupos (Tabela 3.1).

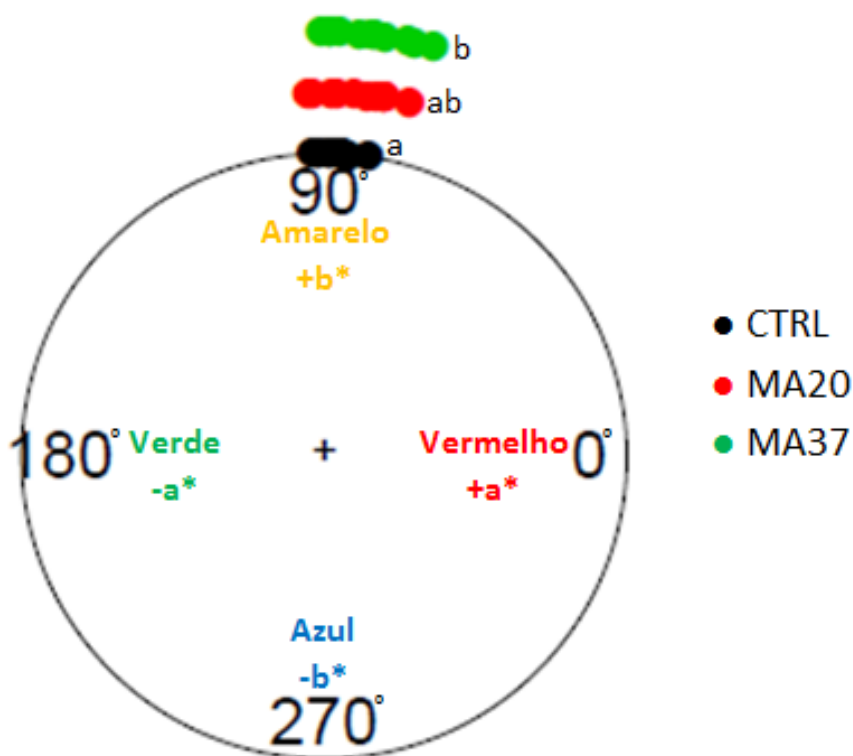


Figura 3.1 - Valores de *hue*, em opérculo de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Para cada grupo encontram-se representados os 11 peixes sujeitos à determinação de cor. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

O valor *hue* representa a cor de um produto. De acordo com o sistema CIELAB (Figura 2.3), se o ângulo estiver entre 0° e 90°, quanto maior este for, mais amarelo é o produto, e, quanto menor for (mais próximo de 0°), mais vermelho é o produto. Os valores de *hue* registados para o opérculo situaram-se próximo dos 90° (Figura 3.1). Estes valores confirmam a cor amarela desta mancha nos três grupos de dourada. Contudo estes valores apresentam diferenças significativas entre o grupo CTRL e o grupo alimentado com a dieta suplementada com a estirpe de microalga geneticamente modificada (MA37), enquanto que o grupo de douradas MA20 (estirpe selvagem da microalga) não diferiu significativamente de nenhum dos grupos anteriores.

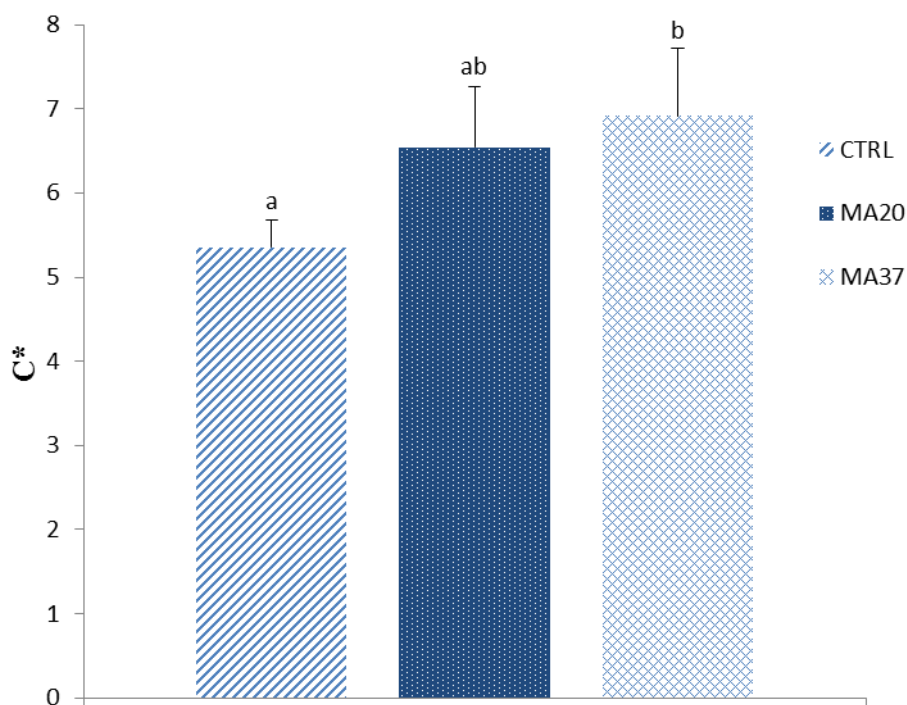


Figura 3.2 - Saturação de cor (C^*), em opérculo de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controle; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Os valores correspondem à média, a barra de erro ao desvio padrão ($n=11$). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Relativamente à intensidade da cor amarela do opérculo (Figura 3.2), verificou-se um padrão muito semelhante ao observado para o *hue*, isto é, diferenças significativas entre os grupos CTRL e MA37, enquanto que o grupo MA20 não se distinguiu significativamente de nenhum destes dois grupos. Pode também observar-se que os valores de *hue* e croma seguem o padrão observado para a coordenada de cor b^* (coloração no intervalo do amarelo).

Em relação à pigmentação da banda interorbital (Figura 2.2), as diferenças observadas para as coordenadas de cor (Tabela 3.2) devem-se sobretudo ao efeito da zona da banda, não se verificando efeito significativo da dieta: as zonas B1 e B3 (junto aos olhos) são idênticas nos três grupos de dourada, distinguindo-se significativamente da zona intermédia (B2). Os resultados evidenciam um ligeiro efeito da dieta e da zona da banda na coordenada a^* , embora não se tenha verificado interação significativa entre estes dois factores.

Tabela 3.2 - Parâmetros de cor em três zonas da banda interorbital de dourada, alimentada com as dietas experimentais. B1: junto ao olho esquerdo; B2: entre os olhos; B3: junto ao olho direito.

Parâmetros de cor	Zonas da banda interorbital	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
		CTRL	MA20	MA37
L*	B1	63,8±2,1 ^a	63,9±1,7 ^a	63,8±1,7 ^a
	B2	60,8±1,9 ^b	60,8±2,3 ^b	61,5±2,7 ^b
	B3	63,4±3,2 ^a	64,8±1,7 ^a	64,7±2,4 ^a
a*	B1	-1,5±0,2 ^a	-1,2±0,2 ^a	-1,2±0,3 ^a
	B2	-1,7±0,2 ^b	-1,5±0,1 ^b	-1,5±0,2 ^b
	B3	-1,4±0,2 ^a	-1,2±0,3 ^a	-1,3±0,4 ^a
b*	B1	4,9±0,9 ^a	4,4±1,4 ^a	4,3±1,3 ^a
	B2	2,2±0,9 ^b	2,1±0,9 ^b	2,4±0,7 ^b
	B3	4,8±1,2 ^a	4,7±1,3 ^a	4,5±1,1 ^a

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=11$). Para cada parâmetro de cor, diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). ¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO.

Os valores dos ângulos *hue* para a banda interorbital situam-se entre os 90° (cor amarela) e 180° (cor verde) (Figura 3.3). Testou-se o efeito da suplementação das rações com as duas estirpes de *P. tricornutum* em comparação com a ração controlo em cada zona da banda, recorrendo à Anova circular e ao teste de comparação múltipla Watson – Williams. Os resultados evidenciaram que a suplementação das rações com a microalga não teve efeito significativo na cor da banda interorbital. As diferenças observadas devem-se ao efeito da zona da banda: as zonas B1 e B3 (junto aos olhos) apresentavam uma cor amarelada mais marcante (valores de *hue* mais próximos dos 90°), distinguindo-se da zona intermédia (B2) que apresentava uma cor esverdeada mais acentuada (valores de *hue* entre 124 – 129 °). Todavia, a zona B2 foi também a zona onde se registou maior variabilidade nos valores de *hue*, em especial para os grupos CTRL e MA20.

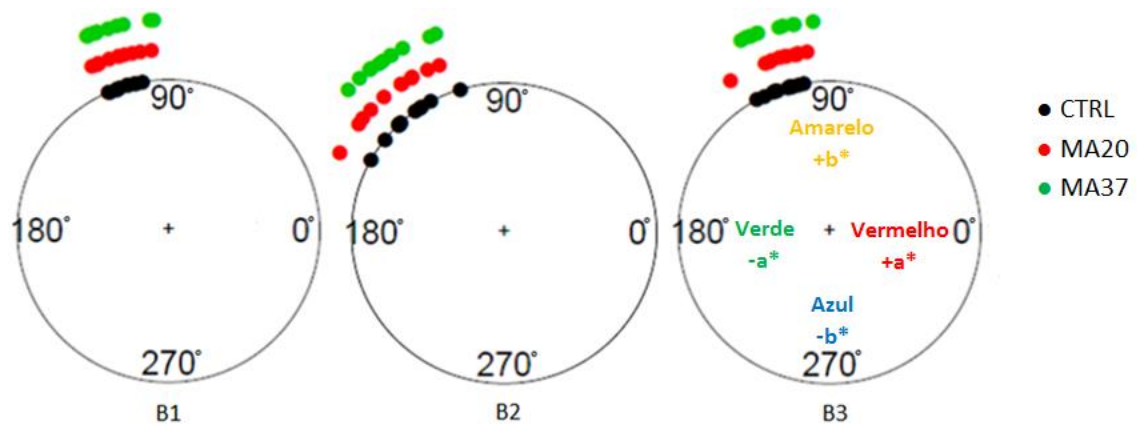


Figura 3.3 - Valores de *hue*, em três zonas da banda interorbital de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controle; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Para cada grupo encontram-se representados os 11 peixes sujeitos à determinação de cor. B1: junto ao olho esquerdo; B2: entre os olhos; B3: junto ao olho direito.

No que respeita à saturação de cor (C^*) na banda interorbital (Figura 3.4), verificou-se que a principal diferença observada foi consequência da zona da banda. As zonas B1 e B3 sem diferenças significativas nos três grupos de peixes (valores médios próximos de 5), diferenciando-se da zona intermédia (B2) (valores médios próximos de 3), com valores de croma superiores.

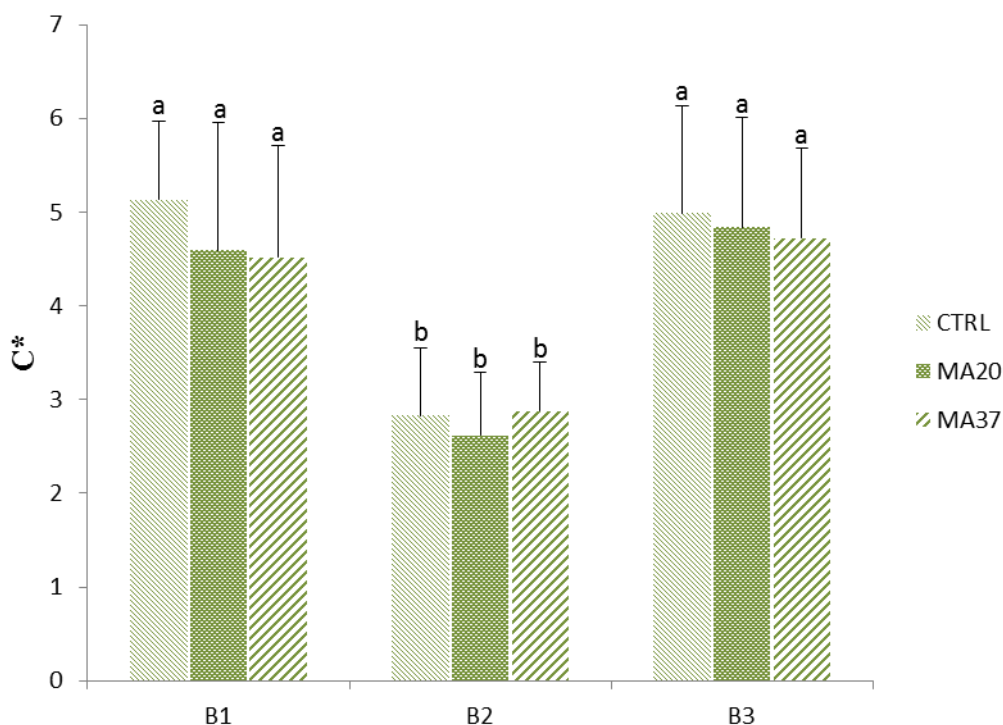


Figura 3.4 - Saturação (C^*), em três zonas da banda interorbital de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Os valores correspondem à média, a barra de erro ao desvio padrão ($n=11$). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). B1: junto ao olho esquerdo; B2: entre os olhos; B3: junto ao olho direito.

No que diz respeito à pigmentação da pele, as diferenças observadas para as coordenadas de cor (Tabela 3.3) devem-se acima de tudo ao efeito da zona da pele, não se verificando efeito significativo da dieta. Em relação à luminosidade todas as zonas se distinguem significativamente entre si, sendo que, a zona ventral (PV) é a mais clara (maiores valores de L^*), seguida da zona dorsal intermédia (PDI) e zona dorsal (PD) que é a zona mais escura (valores de L^* inferiores). Os resultados evidenciam ainda um ligeiro efeito da dieta nesta coordenada, embora não se tenha verificado interação significativa entre estes dois factores. Para o valor de a^* (coloração verde) a zona PD apresenta uma pigmentação esverdeada mais intensa, seguida da zona PV e PDI, ou seja, com *nuances* de verde menos intensa, distinguindo-se significativamente todas as zonas entre si. Em relação ao parâmetro de cor b^* (coloração amarela), a zona PDI apresenta o maior valor de b^* , ou seja, apresenta uma tonalidade amarela mais acentuada, seguida da zona PV e PD. Todas as zonas diferem significativamente entre si.

Tabela 3.3 - Parâmetros de cor em três zonas da pele de dourada, alimentada com as dietas experimentais. PD: zona dorsal; PDI: zona dorsal intermédia; PV: zona ventral.

Parâmetros de cor	Zonas da pele	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
		CTRL	MA20	MA37
L*	PD	64,1±2,0 ^a	64,9±2,0 ^a	65,4±2,2 ^a
	PDI	72,1±1,9 ^b	73,5±2,3 ^b	73,6±2,2 ^b
	PV	82,9±2,3 ^c	84,4±1,3 ^c	84,6±1,3 ^c
a*	PD	-1,5±0,1 ^a	-1,4±0,1 ^a	-1,4±0,2 ^a
	PDI	-0,9±0,2 ^b	-0,8±0,3 ^b	-0,8±0,2 ^b
	PV	-1,4±0,1 ^c	-1,4±0,1 ^c	-1,3±0,2 ^c
b*	PD	0,7±0,4 ^a	0,8±0,3 ^a	1,1±0,6 ^a
	PDI	2,2±0,7 ^b	2,3±0,5 ^b	2,3±0,8 ^b
	PV	1,4±0,3 ^c	1,2±0,6 ^c	1,7±1,0 ^c

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=11$). Para cada parâmetro de cor, diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO.

Os valores dos ângulos *hue* para a pele situam-se entre os 90° e os 180° (Figura 3.5). Após testar o efeito da suplementação das rações com as duas estirpes de *P. tricornutum* em comparação com a ração controlo em cada zona da pele, os resultados mostraram que a suplementação das rações com a microalga não teve efeito significativo na cor da pele. As diferenças observadas devem-se apenas ao efeito da zona da pele: a zona PDI distingue-se das outras duas zonas, apresentando valores de ângulos *hue* inferiores (109 – 114 °), ou seja, mais próximos da cor amarela, enquanto as zonas PD e PV apresentam valores de *hue* superiores, e portanto com tons de verde mais marcantes. As zonas PD e PV foram também as zonas onde se registou maior variabilidade nos valores de *hue*, principalmente para o grupo MA37.

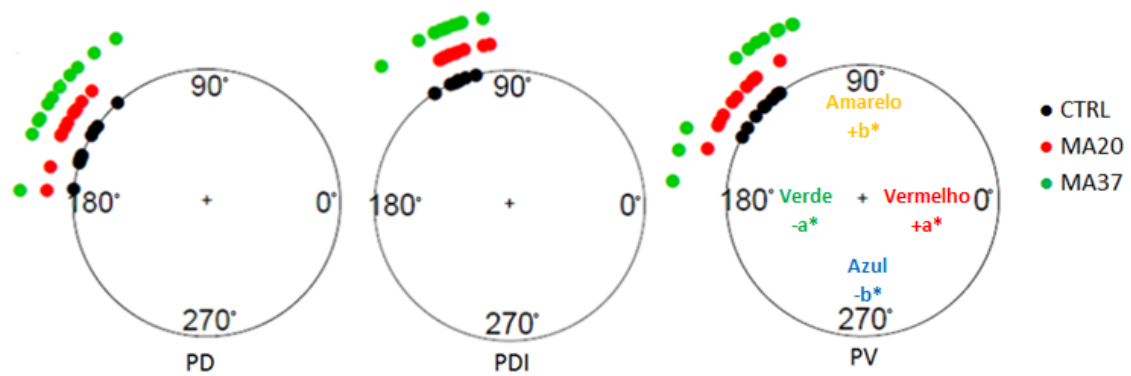


Figura 3.5 - Valores de *hue*, em três zonas da pele de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Para cada grupo encontram-se representados os 11 peixes sujeitos à determinação de cor. PD: zona dorsal; PDI: zona dorsal intermédia; PV: zona ventral.

Não se registaram diferenças significativas em relação à saturação de cor (C^*) na pele (Figura 3.6). A principal diferença observada na intensidade da cor foi devido à zona da pele, em que todas as zonas da pele diferem significativamente entre si. Contudo, a zona PDI destacou-se das zonas PD e PV, e isto justifica-se com os valores de a^* e b^* obtidos para esta zona. Os valores de croma obtidos para a zona PDI vêm também reforçar os valores obtidos em *hue*.

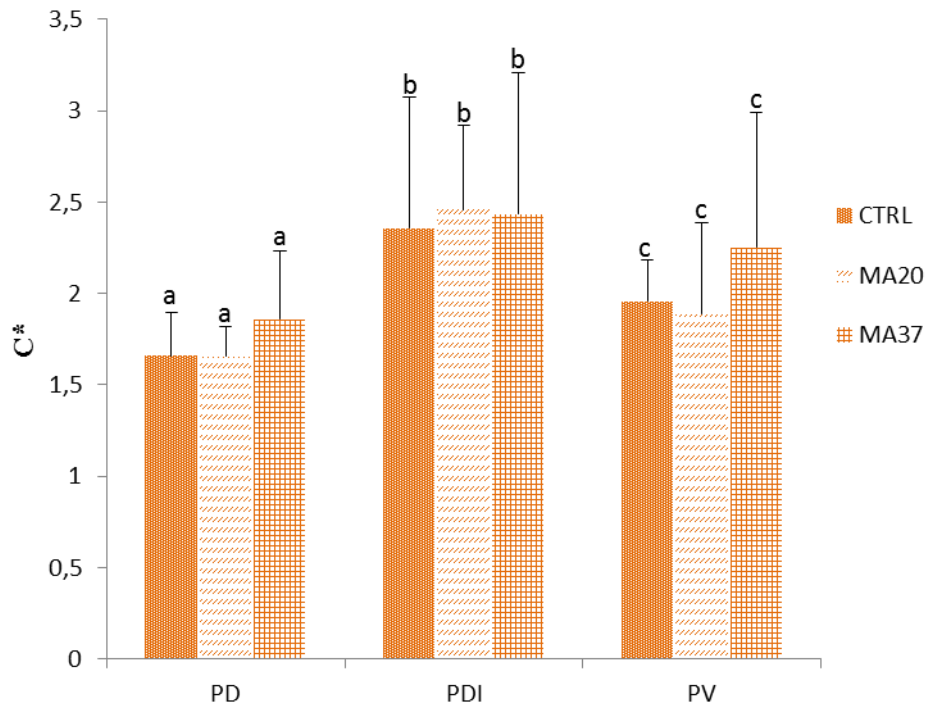


Figura 3.6 - Saturação (C^*), em três zonas da pele de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Os valores correspondem à média, a barra de erro ao desvio padrão ($n=11$). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). PD: zona dorsal; PDI: zona dorsal intermédia; PV: zona ventral.

Relativamente à pigmentação do músculo, as diferenças observadas para as coordenadas de cor (Tabela 3.4) devem-se sobretudo ao efeito da zona do músculo, não se verificando efeito significativo da dieta. No que diz respeito à luminosidade a zona ventral (MV) é a que apresenta maior luminosidade, distinguindo-se significativamente das zonas dorsal (MD) e dorsal intermédia (MDI). Em relação aos parâmetros a^* e b^* , todas as zonas diferem entre si significativamente para ambos os parâmetros.

Tabela 3.4 - Parâmetros de cor em três zonas do músculo de dourada, alimentada com as dietas experimentais. MD: zona dorsal; MDI: zona dorsal intermédia; MV: zona ventral.

Parâmetros de cor	Zonas do músculo	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
		CTRL	MA20	MA37
L*	MD	64,8±2,0 ^a	64,8±1,9 ^a	65,1±1,7 ^a
	MDI	65,3±1,8 ^a	65,7±1,5 ^a	65,7±1,8 ^a
	MV	66,9±1,7 ^b	66,9±1,3 ^b	66,7±1,6 ^b
a*	MD	-2,5±0,2 ^a	-2,4±0,1 ^a	-2,5±0,1 ^a
	MDI	-2,7±0,2 ^b	-2,6±0,2 ^b	-2,6±0,1 ^b
	MV	-2,2±0,2 ^c	-2,3±0,2 ^c	-2,2±0,2 ^c
b*	MD	0,7±0,5 ^a	0,7±0,3 ^a	0,6±0,3 ^a
	MDI	1,0±0,6 ^b	1,1±0,3 ^b	1,0±0,6 ^b
	MV	1,8±0,6 ^c	1,6±0,4 ^c	1,2±0,5 ^c

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=11$). Para cada parâmetro de cor, diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). ¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO.

Para a brancura (W) no músculo (Figura 3.7), verificou-se que a principal diferença observada foi consequência da zona do músculo. A zona MV apresenta valores de W superiores, seguida da zona MD e MDI, nos três grupos em estudo, distinguindo-se significativamente a zona MV das zonas MD e MDI.

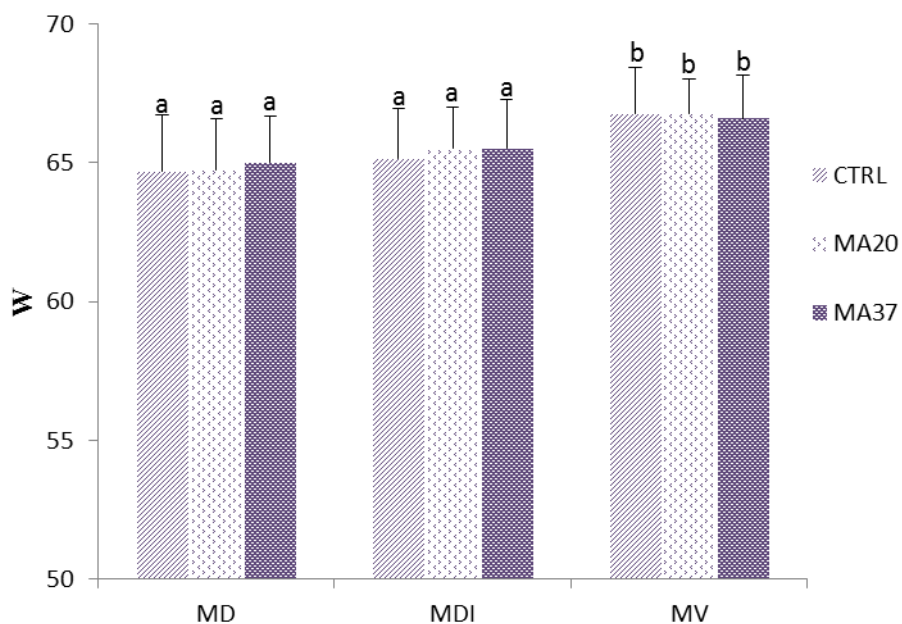


Figura 3.7 - Brancura (W), em três zonas do músculo de dourada alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Os valores correspondem à média, a barra de erro ao desvio padrão ($n=11$). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). MD: zona dorsal; MDI: zona dorsal intermédia; MV: zona ventral.

3.3 Avaliação sensorial

Os resultados sensoriais encontram-se representados no gráfico da Figura 3.8.

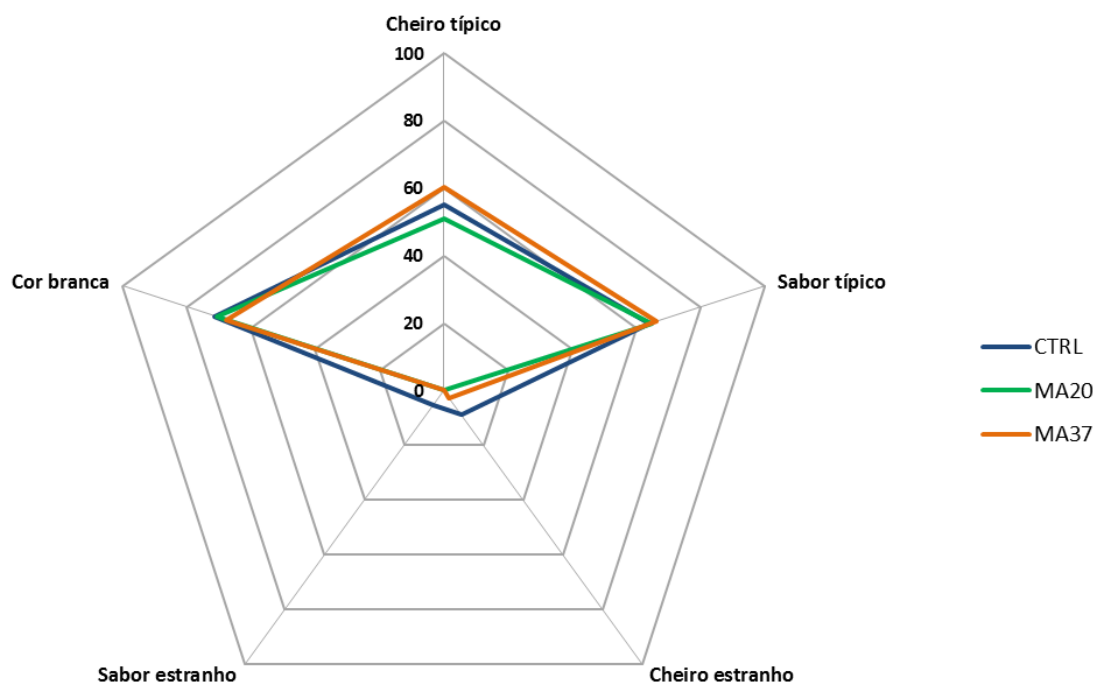


Figura 3.8 - Intensidade (%) dos atributos sensoriais de filetes cozidos de dourada, alimentada com as dietas experimentais. CTRL – controle; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Os resultados correspondem ao valor médio ($n=8$; $4,9 \leq DP \leq 16,6$).

Na avaliação sensorial dos filetes em cozido realizada pelo painel de provadores, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos de peixes em relação ao sabor e cheiro típicos, sabor e cheiro estranhos e cor branca dos filetes. O cheiro e sabor típicos e a cor branca apresentaram valores médios superiores a 50%, 60% e 65% da escala de intensidade respectivamente. O cheiro e sabor estranhos não foram considerados relevantes pelo painel, apresentando valores médios inferiores a 8,8% e 5,3% respectivamente.

3.4 Composição química aproximada

Foram determinados os teores de gordura, proteína, humidade e cinza e os resultados encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Composição química aproximada no músculo de dourada, alimentada com as dietas experimentais.

	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
	CTRL	MA20	MA37
<i>base seca (%)</i>			
Gordura	22,7±4,2	26,0±5,6	28,1±2,4
Proteína	70,1±2,1	68,3±4,1	68,9±2,2
Humidade	1,8±0,4	1,5±0,2	1,8±0,8
Cinza	4,9±0,3	4,7±0,3	4,6±0,2
<i>base húmida (%)*</i>			
Gordura	6,7±1,2	7,6±1,6	8,3±0,6
Proteína	20,7±0,6	20,1±1,2	20,4±0,8
Cinza	1,5±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=5$).¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO. Nota: Os resultados em base húmida foram obtidos, após a aplicação do factor de conversão (aproximadamente 0,295). * Teor de humidade na amostra fresca foi estimado em 71%, com base nos dados da literatura (Matos *et al.*, 2012, 2013) e do laboratório para a dourada.

Não se observaram diferenças significativas entre os três grupos de peixes, para os teores de proteína, humidade e cinza. As diferenças registadas para o teor de gordura entre os três grupos não se revelaram significativas.

3.5 Perfil de ácidos gordos

O resumo dos resultados da composição percentual de ácidos gordos totais e em g/100g nos diferentes grupos experimentais (CTRL, MA20 e MA37) encontram-se nas Tabelas 3.6 e 3.7 respectivamente.

Tabela 3.6 - Perfil de ácidos gordos no músculo de dourada, alimentada com as dietas experimentais, expresso em percentagem (%) dos ácidos gordos totais (base seca).

Ácidos gordos (%)	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
	CTRL	MA20	MA37
14:0	4,6±0,6	4,4±0,5	4,8±0,6
16:0	18,8±1,2	18,0±0,9	18,3±1,3
18:0	3,5±0,2 ^a	3,2±0,2 ^b	3,2±0,1 ^{ab}
∑ Saturados	28,8±1,8	27,6±1,3	28,3±1,9
16:1n-7	7,2±0,7	7,5±0,5	7,4±0,6
18:1n-9	18,4±0,5	18,4±0,2	18,4±0,2
18:1n-7	2,6±0,1	2,6±0,1	2,7±0,1
20:1n-9	1,7±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1
22:1n-11	1,3±0,1	1,6±0,1	1,5±0,2
∑ Monoinsaturados	32,1±0,9	32,8±0,4	32,6±0,4
18:2n-6	7,4±0,3	7,3±0,1	7,6±0,2
18:3n-3	1,1±0,1	1,1±0,04	1,1±0,03
18:4n-3	1,3±0,1	1,4±0,1	1,4±0,04
20:4n-6	1,0±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1
20:5n-3 (EPA)	7,6±0,5	7,6±0,5	7,4±0,4
22:5n-3	2,8±0,3	3,0±0,3	2,9±0,3
22:6n-3 (DHA)	12,0±1,6	11,8±1,2	11,4±1,6
∑ n-3	26,8±2,4	26,9±1,7	26,1±2,2
∑ n-6	9,3±0,3	9,3±0,1	9,5±0,1
∑ Polinsaturados	38,0±2,3	38,1±1,5	37,6±2,1

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=5$). Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). ¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO.

Tabela 3.7 - Composição em ácidos gordos no músculo de dourada, alimentada com as dietas experimentais, expressa em g/100g (base húmida).

Ácidos gordos (g/100g)	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
	CTRL	MA20	MA37
16:0	1,15±0,20	1,27±0,32	1,39±0,19
∑ Saturados	1,76±0,33	1,93±0,48	2,14±0,28
18:1n-9	1,12±0,24	1,28±0,28	1,39±0,11
∑ Monoinsaturados	1,97±0,41	2,29±0,53	2,46±0,21
18:2n-6	0,46±0,10	0,51±0,12	0,57±0,05
18:3n-3	0,07±0,01	0,07±0,02	0,08±0,01
20:4n-6	0,06±0,01	0,06±0,01	0,07±0,01
20:5n-3 (EPA)	0,46±0,09	0,53±0,11	0,55±0,04
22:5n-3	0,17±0,03	0,21±0,04	0,22±0,02
22:6n-3 (DHA)	0,73±0,13	0,81±0,12	0,85±0,09
∑ n-3	1,63±0,30	1,86±0,34	1,97±0,14
∑ n-6	0,57±0,12	0,65±0,14	0,72±0,06
∑ Polinsaturados	2,31±0,44	2,65±0,52	2,84±0,18
<i>Índice Nutricional</i>			
EPA+DHA	1,19±0,22	1,34±0,22	1,41±0,12
n-3/n-6	2,88±0,24	2,88±0,17	2,76±0,24
TI	0,27±0,04	0,25±0,02	0,27±0,03
AI	0,55±0,07	0,52±0,05	0,55±0,07

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=5$). ¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO.

Os ácidos gordos saturados não foram afectados significativamente pelas dietas experimentais. O ácido mirístico (14:0) e o ácido palmítico (16:0) não foram afectados significativamente pelas diferentes dietas, contudo o ácido esteárico (18:0) revelou diferenças significativas entre o grupo CTRL e o MA20, mas só ao nível de %. Os ácidos gordos monoinsaturados totais não foram afectados significativamente pelas dietas testadas. O ácido palmitoléico (16:1n-7) foi superior nas douradas alimentadas com as rações suplementadas com ambas as estirpes de microalga, mas estas diferenças não se revelaram significativas. O ácido oléico (18:1n-9), ácido vacênico (18:1n-7), ácido gondóico (20:1n-9) e ácido cetoleico (22:1n-11) não foram afectados significativamente pelas dietas testadas. Os ácidos gordos polinsaturados também não

foram afectados significativamente pelas diferentes dietas. O ácido araquidónico (20:4n-6), o ácido alfa-linolênico (18:3n-3), EPA (20:5n-3), o ácido linoleico (18:2n-6), o ácido docosapentaenoico (22:5n-3), o ácido estearidônico (18:4n-3) e DHA (22:6n-3) não foram afectados significativamente pelos diferentes tratamentos. Nenhum grupo experimental de douradas difere significativamente entre si em relação aos \sum PUFA n-3 e aos \sum PUFA n-6. A nível nutricional o conteúdo de EPA + DHA não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais, o mesmo se verificou para a proporção de \sum PUFA n-3 / \sum PUFA n-6 e para os índices de trombogenicidade (TI) e aterogenicidade (AI).

3.6 Elementos minerais e metálicos

Foram determinados os elementos minerais e metálicos no músculo de dourada, alimentada com diferentes dietas experimentais e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Concentração de macro elementos (S, Cl, K e Ca), elementos traço (Fe, Cu, Zn e Br), elementos ultra traço (As) e elementos metais (Rb) (base húmida) em músculo de dourada, alimentada com as dietas experimentais.

	DIETAS EXPERIMENTAIS ¹		
	CTRL	MA20	MA37
<i>g kg⁻¹</i>			
S	1,63±0,23	1,56±0,22	1,61±0,25
Cl	0,42±0,03	0,42±0,08	0,43±0,06
K	3,64±0,23	3,49±0,27	3,46±0,21
Ca	0,13±0,03 ^a	0,10±0,02 ^{ab}	0,09±0,02 ^b
<i>mg kg⁻¹</i>			
Fe	3,44±0,76	3,18±0,55	3,89±0,88
Cu	1,10±0,06	1,08±0,06	1,13±0,08
Zn	4,02±0,19	3,94±0,36	3,97±0,30
As	3,00±0,08	3,06±0,26	3,09±0,26
Br	3,10±0,14	3,36±0,36	3,21±0,29
Rb	0,60±0,08	0,71±0,06	0,68±0,04

Os valores correspondem à média ± desvio padrão ($n=5$). Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). ¹ CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricornutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricornutum*, estirpe GMO.

Ao analisar a Tabela 3.8 verificamos que a concentração de cálcio (Ca) presente no músculo de dourada difere significativamente entre o grupo CTRL e o grupo MA37, enquanto que o grupo MA20 não se distinguiu significativamente de nenhum destes dois grupos. Em relação à concentração dos restantes elementos macro, traço, ultra traço e metais presentes no músculo, não se verificaram diferenças significativas entre os três grupos experimentais (Tabela 3.8).

3.7 Grau de oxidação lipídica

Para avaliar o grau de oxidação lipídica dos filetes de dourada analisou-se a evolução dos teores de 20:5n-3 (EPA); 22:6n-3 (DHA) e 16:0 (PA) e o índice de polienos (PI) para cada grupo experimental, ao início (PI t=0) e após 25 semanas de congelação (PI t=25).

A suplementação das dietas com a microalga de ambas as estirpes não afectou significativamente a % de EPA, DHA e PA. As diferenças significativas que se observaram foram para o EPA e DHA (ácidos gordos mais oxidáveis), em todos os grupos de peixes, entre o PI t=0 e o PI t=25, na qual se verificou uma diminuição significativa destes ácidos gordos mais instáveis ao fim de 25 semanas de congelação (Figura 3.9 A)). Os resultados mostram claramente a oxidação que ocorreu nos dois ácidos gordos mais insaturados (EPA e DHA) durante o tempo de conservação a -20 °C. Este efeito foi mais notório no ácido gordo mais insaturado, ou seja com maior número de ligações duplas (DHA).

Relativamente ao PI verifica-se que a suplementação das dietas com a microalga de ambas as estirpes não teve qualquer efeito significativo no que diz respeito ao facto de ter um efeito antioxidante, pois não há diferenças entre os grupos dos três tratamentos. As diferenças significativas que se observaram foram entre o PI t=0 e o PI t=25, na qual se verificou uma diminuição significativa do PI ao fim de 25 semanas de congelação (Figura 3.9 B)). Os resultados obtidos para o PI reflectem os resultados obtidos para os ácidos gordos mais instáveis (EPA e DHA) durante o tempo de conservação a -20 °C.

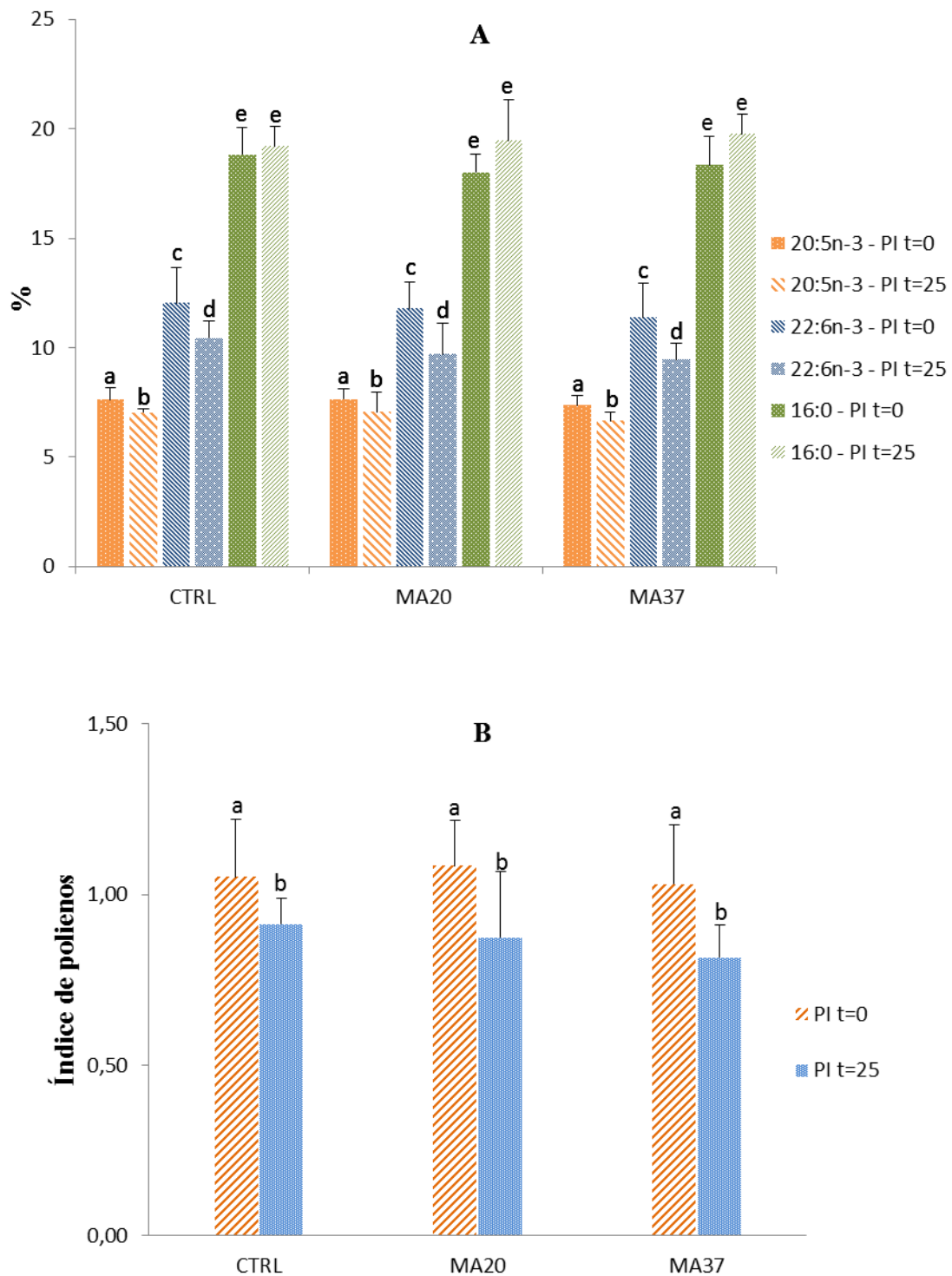


Figura 3.9 - Grau de oxidação lipídica em dourada, alimentada com as dietas experimentais, ao início (PI t=0) e após 25 semanas de congelação (PI t=25). Os valores correspondem à média, a barra de erro corresponde ao desvio padrão; $n=5$ (PI t=0) e $n=3$ (PI t=25). CTRL – controlo; MA20 – suplementada com *P. tricorutum*, estirpe selvagem; MA37 - suplementada com *P. tricorutum*, estirpe GMO. **A**) Evolução dos teores de 20:5n-3 (EPA); 22:6n-3 (DHA) e 16:0 (PA) (% base seca). Para cada ácido gordo diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). **B**) Índice de

polienos (PI = (20:5n-3 + 22:6n-3)/16:0). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

4. Discussão

4.1 Peso e rendimento do filete

Embora os carotenóides sejam conhecidos por terem um papel positivo no metabolismo intermediário do peixe, por aumentarem a utilização de nutrientes e melhorarem o seu crescimento (Amar *et al.*, 2001), neste estudo os grupos de douradas alimentados com as rações suplementadas com 2,5% de biomassa microalgal de duas estripes diferentes de *Phaeodactylum tricornutum* não apresentaram pesos totais diferentes do grupo CTRL, não se verificando qualquer efeito significativo ao nível do crescimento. Estes resultados são similares aos obtidos por outros autores para a mesma espécie (Gomes *et al.*, 2002; Gouveia *et al.*, 2002) e para o pargo vermelho (*Pagrus pagrus*) (Chatzifotis *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2005).

Em relação ao rendimento do filete, a espécie *Sparus aurata*, com tamanho comercial apresenta valores entre 34% - 48% (Grigorakis & Alexis, 2005; Testi *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013), sendo que os valores obtidos neste trabalho (41,6% - 44,7%) estão em concordância com os registados por aqueles autores.

4.2 Cor

A dourada é uma espécie de elevado valor na região do Mediterrâneo e a preferência do consumidor parece centrar-se em indivíduos que apresentam uma cor dourada na banda interorbital, avermelhado no opérculo e uma linha lateral bem marcada, (Gomes *et al.*, 2002). Deste modo as zonas da pele das douradas para determinação instrumental da cor foram seleccionadas tendo como referência a preferência do consumidor, não se desvalorizando o músculo, pelo que também foi analisado.

O melhoramento da cor da pele numa ampla variedade de espécies de peixes, como *P. pagrus* (Cejas *et al.*, 2003; Chatzifotis *et al.*, 2005; Izquierdo *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2005; Pavlidis *et al.*, 2008), *S. aurata* (Gomes *et al.*, 2002; Gouveia *et al.*, 2002; Wassef *et al.*, 2010) e *Cyprinus carpio* (Yuangsoi *et al.*, 2010) tem sido alcançado através da suplementação da dieta com uma variedade de carotenóides naturais puros, extraídos a partir de *Chlorella vulgaris* (Gouveia *et al.*, 2002), *Haematococcus pluvialis*

(Gomes *et al.*, 2002; Chatzifotis *et al.*, 2005) e pimenta vermelha (Wassef *et al.*, 2010), ou mesmo carotenóides sintéticos. Recentemente tem havido uma tendência global no sentido da utilização de fontes naturais de carotenóides, nas dietas de peixes de aquacultura, com o intuito de melhorar a pigmentação da pele (Wassef *et al.*, 2010).

A microalga *P. tricornutum* foi a espécie seleccionada para este estudo, pois para além de ser adequada como alimento no sector da aquacultura e ter uma evidente aptidão para integrar a formulação de alimentos funcionais destinados ao melhoramento nutricional (Guedes *et al.*, 2011) contém ainda um elevado teor de fucoxantina (4382 µg/g MS) (Lemahieu *et al.*, 2013), que aliás é o seu principal pigmento (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001) e um dos carotenóides mais abundantes (Shahidi *et al.*, 1998).

Está bem documentado que a absorção de carotenóides e deposição nos peixes é muito afectada pela composição da dieta, pois os carotenóides são lipossolúveis e seguem as mesmas vias de absorção que os outros lípidos na dieta (Wassef *et al.*, 2010).

Os peixes absorvem os carotenóides da dieta através da mucosa intestinal (Furr & Clark, 1997), transportam-nos através do sangue por meio de lipoproteínas séricas (Bowen *et al.*, 2002), oxidam-nos metabolicamente para outras formas (Katayama *et al.*, 1973) e depositam-nos em células especializadas da pele chamadas cromatóforos (Chatzifotis *et al.*, 2005). Nos peixes, os carotenóides podem ser depositados em vários tipos de tecidos e órgãos, tais como, pele, músculo, gónadas, rim, fígado, intestino e apenas em quantidades muito pequenas no cérebro (Izquierdo *et al.*, 2005). A concentração de carotenóides e distribuição entre os diferentes tecidos de peixes parece depender da espécie, bem como do ciclo de vida (Izquierdo *et al.*, 2005). Por exemplo, os alevins de truta arco-íris acumulam carotenóides na pele, enquanto mais tarde, durante os períodos de crescimento rápido, acumulam os carotenóides principalmente no músculo (Czeczuga *et al.*, 1991).

Os resultados deste estudo mostraram que alimentar as douradas com a dieta suplementada com a estirpe de *P. tricornutum* geneticamente modificada (GMO), potencialmente com níveis mais elevados de fucoxantina, melhorou de forma significativa a pigmentação na zona do opérculo. Os resultados obtidos para o opérculo estão em conformidade com os obtidos por outros autores (Gomes *et al.*, 2002; Gouveia *et al.*, 2002; Wassef *et al.*, 2010), em que se testou o potencial de *H. pluvialis*, *C.*

vulgaris e pimenta vermelha, respectivamente, como fonte de carotenóides na pigmentação da pele de douradas (incluindo a zona do opérculo). Estes resultados sugerem que os carotenóides naturais presentes na dieta a partir de *P. tricornutum*, principalmente a fucoxantina, podem ser eficazmente bio-absorvidos e depositados no opérculo de dourada.

Em relação à zona da banda interorbital, verificou-se que a suplementação das rações com ambas as estirpes da microalga não melhorou a pigmentação nesta zona. Os resultados diferem dos obtidos por Gomes *et al.*, (2002) e Gouveia *et al.*, (2002), em que se verificou uma melhoria da pigmentação nesta zona.

A suplementação das dietas com a microalga *P. tricornutum*, estirpe selvagem e GMO, também não influenciou a luminosidade da pele (corpo) de dourada. Resultados similares foram encontrados por outros autores para as espécies *P. pagrus* (Chatzifotis *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2005) e *C. carpio* (Yuangsoi *et al.*, 2010). A pigmentação da pele dos vertebrados é modificada por inúmeros factores, como por exemplo, a cor do fundo, estimulação hormonal e iluminação (Duray *et al.*, 1996; Crook, 1997; Rotllant *et al.*, 2003). O stresse provocado pelo manuseamento e os métodos de abate também estão entre os factores que influenciam negativamente a luminosidade da pele do peixe (Lin *et al.*, 1998).

Os valores de croma e *hue* na pele também não foram afectados significativamente pela suplementação das dietas com ambas as estirpes de *P. tricornutum*, não sendo detectadas melhorias na pigmentação. Gomes *et al.*, (2002) e Gouveia *et al.*, (2002) obtiveram nos seus estudos melhorias na pigmentação da pele. Chatzifotis *et al.*, (2005) e Kalinowski *et al.*, (2005) obtiveram também diferenças significativas nos parâmetros de croma e *hue*.

A ausência de efeito da microalga *P. tricornutum* na banda interorbital e na pele pode dever-se a várias razões: a mesma fonte de carotenóides pode proporcionar diferentes resultados dependendo da zona do corpo do peixe em questão. Por exemplo, a fonte de carotenóides *C. vulgaris* fornece uma pigmentação na dourada superior nas zonas da banda interorbital e barbatana dorsal e inferior na zona do opérculo e linha lateral (Gouveia *et al.*, 2002). Já com a espécie *H. pluvialis* obtém-se para a zona da banda

interorbital uma maior concentração de carotenóides do que para as zonas do opérculo e barbatana dorsal (Gomes *et al.*, 2002). Assim, deve-se testar a inclusão de duas fontes de carotenóides diferentes na dieta, de modo a entender se pode ou não ser uma boa estratégia para melhorar a coloração da pele nestas zonas. Torrissen, (1989) descobriu que uma combinação de astaxantina livre e cantaxantina na dieta fornecia um nível mais elevado de carotenóides totais no músculo do que qualquer um dos dois carotenóides sozinho, em truta arco-íris. Synowiecki *et al.*, (1993) também conseguiram a cor adequada em *Salvelinus alpinus* quando incluíram na dieta astaxantina e cantaxantina. Contudo, nos estudos de Gouveia *et al.*, (2002) a dieta que combinava biomassa algal com astaxantina sintética forneceu a menor concentração de carotenóides, independentemente da zona, o que sugere a competição entre os carotenóides pela sua absorção como foi mostrado também para a truta arco-íris (Guillou *et al.*, 1992).

Suplementar as dietas com uma maior quantidade de carotenóides, com o objectivo de aumentar a ingestão de carotenóides a partir da dieta pode também ser uma opção que deve ser testada. Deve ter-se em conta que a quantidade de carotenóides que aparenta ser ingerida ao invés de ficar retida no peixe é muito elevada, o que sugere que alguns carotenóides são divididos no tracto digestivo (Storebakken *et al.*, 1987), possivelmente durante a formação da vitamina A ou através da oxidação (Torrissen *et al.*, 1990). Também o facto da retenção dos carotenóides ser baixa e a perda ser muito elevada deve-se a quatro factores principais: 1) destruição de carotenóides durante o processamento de alimentos e posterior armazenamento, 2) desperdício alimentar, 3) má absorção de carotenóides ingeridos e 4) metabolismo de absorção de carotenóides (Torrissen *et al.*, 1990). Num estudo, as dietas suplementadas com cantaxantina afectaram a coloração da pele de pargo, dando uma tonalidade amarelada e valores de croma atípicos, o que levou a pensar que o facto de aumentar a ingestão de carotenóides a partir da dieta elevaria os valores de croma, mas na verdade, reduziu os valores de croma no pargo vermelho (*P. pagrus*) (Izquierdo *et al.*, 2005). Essa redução da deposição de carotenóides pode ser explicada por uma limitação da taxa de absorção (Torrissen *et al.*, 1990). Contudo são necessários mais estudos para saber com exactidão se para a dourada acontece ou não o mesmo com o pigmento em questão, a fucoxantina.

É ainda bem conhecido que a eficácia da fonte de carotenóides em termos de deposição e pigmentação é específico da espécie e de que todas as espécies não possuem a mesma

via no que respeita ao metabolismo de carotenóides, e, por conseguinte, não há transformação universal de carotenóides nos tecidos dos peixes (Pavlidis *et al.*, 2006). Por exemplo, a luteína, β -caroteno, zeaxantina e cantaxantina não tiveram qualquer efeito no fornecimento de coloração vermelha em *Pagrus major* (Ha *et al.*, 1993). A dourada é capaz de utilizar eficientemente carotenóides naturais ou sintéticos a partir da dieta, como a astaxantina, cantaxantina, apo- β -caroteno e luteína, que resultaram num aumento de carotenóides totais em três zonas da pele (banda interorbital, opérculo e ao longo da barbatana dorsal) (Gomes *et al.*, 2002; Gouveia *et al.*, 2002). Contudo e apesar dos níveis elevados de astaxantina no plasma, mostrando que a astaxantina da dieta pode ser efectivamente bio-absorvida pela dourada, a ausência de um efeito significativo das várias fontes de astaxantina sobre o reforço da pigmentação da pele na dourada sugere que a astaxantina provavelmente não é um pigmento de grande importância para a pigmentação desta espécie (Gomes *et al.*, 2002) e que ésteres de luteína e de epiluteína representaram quase a totalidade dos pigmentos presentes nas amostras da pele (Gomes *et al.*, 2002).

No presente estudo, a inclusão nas dietas da microalga *P. tricornutum*, estirpes selvagem e GMO, contendo diferentes percentagens de fucoxantina, não se mostrou eficaz no reforço da pigmentação da pele de dourada ao nível da banda interorbital e da pele, o que sugere que a fucoxantina pode não ser o pigmento de maior importância nesta espécie nas zonas referidas.

Relativamente ao músculo, a suplementação das dietas com as estirpes de *P. tricornutum* também não influenciou significativamente os parâmetros de cor. Estes resultados estão em conformidade com os de Gomes *et al.*, (2002) e Gouveia *et al.*, (2002), em que teores muito baixos de carotenóides foram detectados no músculo dorsal. Uma outra explicação para estes resultados é o facto dos mecanismos de deposição dos carotenóides em douradas parecerem diferentes dos mecanismos da espécie *P. pagrus* (Tanaka *et al.*, 1976).

Muitas experiências têm sido conduzidas para conseguir determinar o nível de carotenóides necessários a adicionar para diferentes espécies de peixes, de modo a obter o nível requerido para a coloração de pele /filetes (Wassef *et al.*, 2010). A pigmentação que os carotenóides podem fornecer é afectada pela fonte de pigmentos na dieta,

dosagem, duração em que essa alimentação específica é fornecida, composição da dieta (Bjerkeng, 2000), digestibilidade e o tipo de processamento alimentar empregue (Shahidi *et al.*, 1998), sendo por isso, de grande importância escolher os ingredientes apropriados para as rações de modo a fornecer à pele de douradas de aquacultura a cor desejada (Wassef *et al.*, 2010). Neste estudo, apesar da microalga *P. tricornutum* estirpe GMO fornecer uma melhor pigmentação na zona do opérculo dos peixes alimentados com esta dieta, não se verificaram melhorias na pigmentação das restantes zonas da pele (banda interorbital e pele). Deste modo, poderá ser necessário testar níveis de inclusão mais elevados de *P. tricornutum* estirpe GMO na dieta, bem como continuar a avaliar outras fontes de carotenóides, para validar com exactidão a sua eficácia como meio para modular a pigmentação da pele de dourada. Seriam úteis novos estudos no futuro para procurar saber a concentração de carotenóides totais nas várias zonas de medição de cor de dourada alimentada com dietas com diferentes concentrações de fucoxantina e outros carotenóides, de modo a saber qual é o pigmento utilizado com maior eficácia na pigmentação da pele e em que zona e quantidade. Ainda há muito a fazer para conseguir determinar com exactidão a fonte de carotenóides na dieta como uma via para atingir a pigmentação da pele em douradas, pois há inúmeros factores envolvidos nesse processo.

4.3 Avaliação sensorial

No presente estudo não se registaram diferenças significativas nas propriedades sensoriais entre os três grupos de dourada, designadamente o cheiro, sabor e a cor do filete (cozido). Estes resultados sugerem que a inclusão da microalga *P. tricornutum* (estirpes selvagem e GMO) nas rações de dourada, com o objectivo de conferir maior pigmentação em zonas estratégicas, pode ser conseguida sem que as propriedades organolépticas dos peixes sejam afectadas negativamente.

De um modo geral, os resultados encontrados na literatura sobre os efeitos da substituição e/ou inclusão de ingredientes nas rações de dourada nas propriedades sensoriais são um pouco contraditórias. Num estudo realizado em douradas Izquierdo *et al.*, (2005) não foram encontradas diferenças significativas relativamente aos parâmetros sensoriais entre o grupo controlo alimentado com óleo de peixe, e os grupos experimentais alimentados com óleo de linhaça e de colza, com um nível de substituição de 60%. Num estudo mais recente (Fountoulaki *et al.*, 2009) também não foram encontradas diferenças significativas nas propriedades organolépticas dos peixes entre o grupo controlo, alimentado com óleo de peixe, e os restantes grupos experimentais

alimentados com óleos vegetais, com um nível de substituição de 69%. Por outro lado, um estudo realizado por (Matos *et al.*, 2012), não revelou diferenças organolépticas entre as douradas alimentadas com óleo de peixe e douradas alimentadas com óleos vegetais, no entanto, a fonte de proteína nas dietas afectou um pouco a percepção do odor típico e da cor branca dos filetes, enquanto que o sabor típico e percepção de gordura não foram afectados pelos diferentes tratamentos.

4.4 Composição química aproximada

Segundo Grigorakis (2007), a composição do músculo é o aspecto de qualidade com maior relevância na frescura do peixe e alterações nesta composição podem ter consequências a nível de marketing.

A composição bioquímica dos peixes é fortemente afectada pela composição da sua alimentação (Orban *et al.*, 2007). A inclusão de ambas as estirpes da microalga *P. tricornutum* em ração de dourada não teve efeito na composição química do filete. Em especial, os valores de gordura e proteína registados nos três grupos de dourada encontram-se no intervalo de valores publicados em vários estudos para a mesma espécie (Grigorakis *et al.*, 2002, 2003; Grigorakis, 2007; Silva *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2012, 2013).

4.5 Perfil de ácidos gordos

Os filetes crus de dourada apresentaram valores médios de ácidos gordos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados (PUFA), n-3 PUFA, n-6 PUFA, 20:5n-3 (EPA) e 22:6n-3 (DHA) de acordo com valores anteriormente registados para esta espécie (Grigorakis *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Testi *et al.*, 2006; Grigorakis, 2007; Mnari *et al.*, 2007; Senso *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2015).

A dieta é o principal factor que afecta o teor de n-3 e n-6 PUFA no músculo dos peixes, mas o local, a espécie, a estação do ano e as condições ambientais também podem contribuir (Hossain, 2011). Sargent *et al.*, (1989) também verificaram que é tecnicamente possível produzir um peixe com uma proporção de n-3/n-6 PUFA que seja óptima do ponto de vista da nutrição humana. No presente estudo os valores da razão n-3/n-6 PUFA, não se distinguiram significativamente entre os tratamentos, registando-se valores médios próximos de 2,8, semelhantes aos obtidos em diversos estudos

(Grigorakis *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Testi *et al.*, 2006; Grigorakis, 2007; Mnari *et al.*, 2007; Senso *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2015). Normalmente, os produtos da pesca e aquacultura apresentam uma razão n-3/n-6 PUFA muito equilibrada o que do ponto de vista nutricional é altamente desejável e benéfico para a dieta humana (Hossain, 2011). Portanto, peixe com razões n-3/n-6 PUFA mais elevadas deve ser recomendado para consumo (EFSA, 2010; Hossain, 2011).

O teor de EPA + DHA nos três grupos de dourada variou entre 1,19 e 1,41 g/100g e os valores estão em concordância com os obtidos por vários autores (Grigorakis *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Testi *et al.*, 2006; Grigorakis, 2007; Mnari *et al.*, 2007; Senso *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2015). A recomendação é de consumir 0,3 a 0,5 g / dia de EPA + DHA (Kris-Etherton *et al.*, 2002; EFSA, 2010).

Os índices de aterogenicidade (AI) e trombogenicidade (TI) permitem avaliar a qualidade nutricional. Os índices AI e TI indicam o potencial de estímulo à agregação plaquetária, ou seja, quanto menores os valores de AI e TI, maior é a quantidade de ácidos gordos antiaterogénicos presentes em determinadas gorduras e, conseqüentemente, maior é o potencial de prevenção ao aparecimento de doenças coronárias (Turan *et al.*, 2007). Os índices AI e TI não diferiram estatisticamente entre os diferentes grupos de dourada. Valores similares para estes índices foram encontrados em outros estudos (Grigorakis *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Grigorakis, 2007; Mnari *et al.*, 2007; Senso *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2015).

O EPA constitui entre 27% e 30% de todos os ácidos gordos presentes na microalga *P. tricornutum* (Atalah *et al.*, 2007), fazendo ainda parte maioritariamente o ácido palmitoléico (26%) e o ácido palmítico (17%) (Domergue *et al.*, 2003). Contudo, estas percentagens de ácidos gordos maioritariamente presentes na microalga não se reflectiram no perfil de ácidos gordos das douradas alimentadas com as rações suplementadas. Uma explicação para este facto pode ser a pequena quantidade de biomassa de microalga que foi incorporada nas rações suplementadas. Por outro lado, tendo em conta que a principal fonte de lípidos usada nas rações suplementadas e na ração controlo foi o óleo de peixe e na mesma quantidade, é natural que não se tenha registado alteração significativa no teor de gordura no músculo de dourada nem na sua qualidade, reflectida pela composição em ácidos gordos e pelos índices nutricionais.

4.6 Elementos minerais e metálicos

Os macroelementos são considerados essenciais e as suas principais funções incluem a estrutura do esqueleto, manutenção do sistema coloidal e regulação do equilíbrio ácido-base (Lourenço *et al.*, 2012). O potássio (K) foi o elemento mais abundante no músculo de dourada e o seu valor foi similar ao reportado por outros autores (Ersoy & Çelik, 2010; Custódio *et al.*, 2011; Lourenço *et al.*, 2012). O cálcio (Ca) foi o macro elemento em menor concentração no músculo de dourada mas os valores coincidiram com os de Ersoy & Çelik (2010) e Lourenço *et al.*, (2012).

Os elementos traço e ultra traço são necessários para inúmeros processos químicos no metabolismo (formação e síntese de determinadas proteínas, enzimas, vitaminas e hormonas) (Lourenço *et al.*, 2012). O zinco (Zn) foi o elemento mais abundante e o seu valor está de acordo com o de vários autores (Türkmen *et al.*, 2005; Minganti *et al.*, 2010; Custódio *et al.*, 2011; Lourenço *et al.*, 2012; Aksan & Ergül, 2013). O ferro (Fe) foi o que apresentou uma concentração maior a seguir ao Zn. Concentrações idênticas foram encontradas por outros autores (Türkmen *et al.*, 2005; Minganti *et al.*, 2010; Lourenço *et al.*, 2012; Aksan & Ergül 2013). O cobre (Cu) apresentou a concentração mais baixa, contudo são valores aceitáveis e que também foram obtidos em outros estudos (Canli & Atli 2003; Ersoy & Çelik 2010; Lourenço *et al.*, 2012). A concentração de bromo (Br) presente no músculo de dourada está em concordância com a obtida por Custódio *et al.*, (2011). Com o arsénio (As) o assunto ainda é um pouco contraditório, pois as suas funções biológicas ainda são consideradas incertas. A concentração de As obtida vai de encontro à obtida por Custódio *et al.*, (2011), contudo na literatura diferentes concentrações de As podem ser encontradas, desde as mais baixas (Aksan & Ergül, 2013) às mais elevadas (Minganti *et al.*, 2010). Por fim o rubídio apresenta valores também similares aos encontrados por Custódio *et al.*, (2011).

A microalga *P. tricornutum* é rica em cálcio, potássio, sódio e magnésio (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001), contudo o teor de potássio não se destacou nos grupos de dourada alimentados com as rações suplementadas e o sódio e magnésio não foram sequer detectados. Relativamente ao cálcio, registaram-se concentrações mais elevadas no grupo controlo, embora se tenha distinguido significativamente apenas do grupo alimentado com a ração suplementada com a estirpe GMO de *P. tricornutum*.

4.7 Grau de oxidação lipídica

A degradação de PUFA's durante o armazenamento e processamento de óleos de peixe e peixes gordos leva à formação de compostos voláteis associados com ao ranço (Pazos *et al.*, 2005). Assim, o armazenamento em congelado tem sido amplamente utilizado para reter as propriedades sensoriais e nutricionais do peixe (Lugasi *et al.*, 2007). Embora o armazenamento em congelado de peixes possa inibir a deterioração microbiana, existem uma série de alterações às quais as proteínas musculares são submetidas, que levam a modificações nas suas propriedades estruturais e funcionais (Badii & Howell, 2002). O grau das alterações depende das espécies de peixes, da presença ou ausência de activadores e inibidores e das condições de armazenamento (Pazos *et al.*, 2005). Quando o oxigénio entra em contacto com os peixes durante o armazenamento em congelado, as gorduras e os óleos ficam oxidados (rançosos). A susceptibilidade à rancidez depende não só da quantidade de lípidos presente, mas também da composição lipídica e da sua localização no tecido de peixe (Nazemroaya *et al.*, 2011). As alterações oxidativas nos lípidos de peixe congelado podem ser causadas pelo desenvolvimento de radicais (Sahari *et al.*, 2014), que são facilmente formados em peixes marinhos, como a dourada, por serem ricos em n-3 PUFA (Senso *et al.*, 2007), que se caracterizam por apresentarem cadeia longa com elevado número de ligações duplas (maior susceptibilidade à oxidação, em presença de factores promotores do processo oxidativo) (Huss, 1995).

Tem sido sugerido que a razão $(20:5n-3 + 22:6n-3)/16:0$ (índice de polienos - PI), representando a razão entre os ácidos gordos mais instáveis e os mais estáveis, constitui um bom índice para avaliar o grau de oxidação lipídica (Osman *et al.*, 2001; Özogul *et al.*, 2006; Pirestani *et al.*, 2010). Uma diminuição dos valores de PI durante o armazenamento indica que existe uma decomposição de PUFA's (Simat *et al.*, 2015). A diminuição do PI indica um aumento do desenvolvimento da oxidação de lípidos, como um resultado do tempo de armazenamento em congelado (Taheri *et al.*, 2012).

No presente estudo a diferença significativa observada entre o PI inicial e o PI final (25 semanas de congelação a -20 °C), em todos os tratamentos, revelou que os mecanismos de oxidação estão activos durante o armazenamento em congelado. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores que descrevem haver um decréscimo progressivo na

razão de (20:5n-3 + 22:6n-3)/16:0 com o tempo de congelação (Pirestani *et al.*, 2010; Nazemroaya *et al.*, 2011; Moini *et al.*, 2012; Taheri *et al.*, 2012).

Contudo, o principal objectivo ao avaliar o grau de oxidação lipídica foi averiguar se a suplementação das dietas com as estirpes selvagem, e GMO da microalga *P. tricornutum* conferia algum efeito antioxidante aos grupos de douradas alimentadas com estas dietas, dadas as substâncias antioxidantes que a microalga possui. Verificou-se que esta suplementação não teve qualquer efeito antioxidante e que o processo oxidativo não foi diferente, em comparação com as douradas do grupo controlo. Estes resultados podem dever-se ao facto da dieta ser suplementada apenas com 2,5% de biomassa microalgal, o que pode não ser suficiente para obtenção de efeito notório.

5. Conclusões

O presente estudo permite concluir que a inclusão de 2,5% de biomassa da estirpe geneticamente modificada da microalga *P. tricornutum*, com níveis de fucoxantina potencialmente mais elevados, na ração de acabamento para dourada, contribuiu para um reforço significativo da pigmentação da mancha amarela no opérculo, comparativamente com os grupos alimentados com a dieta controlo e a dieta suplementada com 2,5% de biomassa da estirpe selvagem de *P. tricornutum*. Em relação às restantes zonas da pele, não se verificaram melhorias significativas da pigmentação.

A suplementação das rações com *P. tricornutum*, estirpe selvagem e GMO, não causou alterações significativas na composição química do músculo de dourada: não alterou a composição mineral, nem os teores proteicos e lipídicos, registando-se teores adequados. Também não se registou alterações no equilíbrio de ácidos gordos n-3/n-6 PUFA nem na contribuição de EPA + DHA.

Relativamente à qualidade sensorial, a suplementação das rações com *P. tricornutum* não conferiu cheiro nem sabores estranhos ao músculo de dourada nem alterou a cor característica do filete.

Atendendo às propriedades antioxidantes da microalga *P. tricornutum*, era expectável uma contribuição para um menor grau de oxidação lipídica, durante a conservação em congelado, no músculo de dourada alimentada com as rações suplementadas com a microalga. Contudo, não se verificou este efeito.

Como conclusão final, a inclusão 2,5% de biomassa de *P. tricornutum*, estirpe GMO, com níveis de fucoxantina potencialmente mais elevados, em dietas de acabamento para dourada, acabou por cumprir o objectivo pretendido, melhorando a pigmentação em zonas estratégicas da pele, de modo a tornar esta espécie um produto mais apelativo para o consumidor, sem comprometer o seu valor nutricional e as suas propriedades sensoriais.

6. Bibliografía

- Agostinelli, C., & Lund, U. (2013). R package 'circular': Circular Statistics (version 0.4-7). URL: <https://r-forge.r-project.org/projects/circular/>.
- Aksan, S., & Ergül, H. A. (2013). Assessment of element concentrations in widely consumed cultured fish in Turkey. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 30(2), 77–81.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. N., & Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, 72, 33–40.
- Álvarez, A., García García, B., Jordán, M. J., Martínez-Conesa, C., & Hernández, M. D. (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, 132, 1395–1405.
- Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., & Watanabe, T. (2001). Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 32(Suppl. 1), 162–173.
- Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., & Watanabe, T. (2004). Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish and Shellfish Immunology*, 16, 527–537.
- AOAC, 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th Ed., 4th Rev.; Association of Official Analytical Chemists International, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, CD-ROM.
- Apt, K. E., & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, 35, 215–226.
- Arao, T., Kawaguchi, A., & Yamada, M. (1987). Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochemistry*, 26, 2573-2576.
- Atalah, E., Cruz, C. M. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A., & Robaina, L. (2007). Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 270, 178–185.
- Badii, F., & Howell, N. K. (2002). Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. *Food hydrocolloids*, 16(4), 313-319.
- Basurco, B., Lovatelli, A., & García, B. (2011). Current status of Sparidae aquaculture. In: Pavlidis, M. A., & Mylonas, C. C. (Ed.). Sparidae: biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 1-50.
- Bauchot, M. L., Hureau, J. C., & Miguel, J. C. (1981). Sparidae. In: Fischer, W., Bianchi, G., & Scott, W. B. (Ed.). FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic; fishing areas, 34, 47 (in part). Vol. IV: var. pag. FAO, Rome.
- Becker, W. (2004). Microalgae for aquaculture: The nutrition value of microalgae for aquaculture. In: Richmond, A. (Ed.). Handbook of microalgal culture. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, Part III, Chapter 21.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., & Sargent, J.R. (1995). Effects of different dietary arachidonic acid:docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 14

(2), 139–151.

- Bendiksen, E. Å., Johnsen, C. A., Olsen, H. J., & Jobling, M. (2011). Sustainable aquafeeds: Progress towards reduced reliance upon marine ingredients in diets for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 314, 132–139.
- Bertrand, M. (2010). Carotenoid biosynthesis in diatoms. *Photosynth. Res.*, 106, 89–102.
- Bhaya, D., & Grossman, A. (1991). Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol. Gen. Genet.*, 229, 400–404.
- Bharathiraja, K., Hari Babu, L., Vijayaprakash, S., Tamilselvan, P., & Balasubramanian, M. P. (2013). Fucoxanthin, a marine carotenoid protects cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 3, 201–207.
- Biesalski, H. K. (1992). Vitamins and carotenoids as biological antioxidants. Research and Practical Experience Ed.33. 4th Forum on Livestock Nutrition, 4–5 November 1992. BASF Fine Chemicals.
- Bjerkeng, B. (2000). Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., & Civera-Cerecedo, R. (Ed.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.*
- Botta, J. R. (1995). Evaluation of seafood freshness quality. VCH Publishers, New York. viii, 180 pp.
- Bowen, J., Soutar, C., Serwata, R. D., Lagocki, S., White, D A., Davies, S J., & Young, A. J. (2002). Utilization of (3S, 3'S)-astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 8, 59–68.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., *et al.*, (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456, 239–244.
- Canli, M., & Atli, G. (2003). The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, 121, 129–136.
- Carvalho, M. L., Santiago, S., & Nunes, M. L. (2005). Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 426–432.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Tejera, N., Jerez, S., Bolaños, A., & Lorenzo, A. (2003). Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture*, 218, 457–469.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2012). Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: Effects on the immune system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1729–1739.
- Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1–14.
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Jimeno, C. D., Vardanis, G., Steriotti, A., & Divanach, P. (2005). The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research*, 36, 1517–1525.
- Cohen, Z., Von Shak, A., & Richmond, A. (1988). Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. Phycol.*, 24, 328–332.
- CIE. (1976). Colorimetry. Commission Internationale de l'Éclairage, vol. 15. CIE Publication, Paris.

- CIE (Commission Internationale de l' Eclairage). (1978). Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No 2 to CIE Publication No 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris.
- Connell, J.J. (1975). Control of fish quality. Fishing News Books Ltd., London.
- Crook, A. C. (1997). Colour patterns in a coral reef fish. Is background complexity important? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 217, 237–252.
- Custódio, P. J., Pessanha, S., Pereira, C., Carvalho, M. L., & Nunes, M. L. (2011). Comparative study of elemental content in farmed and wild life Sea Bass and Gilthead Bream from four different sites by FAAS and EDXRF. *Food Chemistry*, 124, 367–372.
- Czeczuga, B., Stenross, S., Christensen, S. N., & Ahti, T. (1991). Variability of carotenoid composition in some species of the lichen genera *Cladonia* and *Cladina*. *Annales Botanici Fennici*, 28(2), 123-130.
- De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F., Rogato, A., Bowler, C., & Falciatore, A. (2009). Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Research*, 37(14), e96.
- Dembitsky, V.M., & Maoka, T. (2007). Allenic and cumulenenic lipids. *Prog. Lipid Res.*, 46, 328–75.
- Diniz, M. (1998). A aquacultura. In: Henriques, M. A. R. (Ed.). Manual de Aquacultura. Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 13–15.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., & Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe — Consensus document. *Br. J. Nutr.*, 81, S1–S27.
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P. G., Boland, W., Zahringer, U., & Heinz, E. (2003). New insight into *Phaeodactylum tricorutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturases^[w]. *Plant Physiology*, 131, 1648–1660.
- Duerr, E. O., Molnar, A., & Sato, V. (1998) Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.*, 6, 65–70.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Leroi, J.M., & Jeffrey, S.W. (1994). Essential polyunsaturated fatty-acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 35, 155–161.
- Duray, M. N., Estudillo, C. B., & Alpasan, L. G. (1996). The effect of background color and rotifer density on rotifer intake, growth and survival of the grouper (*Epinephelus suillus*) larvae. *Aquaculture*, 146, 217–224.
- EC. (2014). The EU fish market. European Union, Brussels.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *Efsa J.*, 8(3), 1461.
- Ersoy, B., & Çelik, M. (2010). The essential and toxic elements in tissues of six commercial demersal fish from Eastern Mediterranean Sea. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1377–1382.
- FAO. (2003). Food energy - methods of analysis and conversion factors. FAO Food and Nutrition Paper 77. FAO, Rome.
- FAO. (2009). The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome.

- FAO. (2013). FAO Statistical Yearbook: World Food and Agriculture. FAO, Rome.
- FAO. (2014). FishStat plus. Capture production 1950-2012; Aquaculture production 1950-2012.
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. FAO, Rome.
- Fischer, W., Bianchi, G., & Scott, W.B. (Ed). (1981). FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic; fishing areas 34, 47 (in part). Canada Funds-in-Trust. Ottawa, Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Vol. IV.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497–509.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B., & Alexis, M. N. (2009). Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. *Aquaculture*, 289, 317–326.
- Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., & Dufrière, Y. F. (2008). Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1344–1356.
- Frankel, E. (1998). Antioxidants. In: Lipid Oxidation. Dundee, Scotland, UK: The Oily Press.
- Fraser, O., & Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish-an introduction. *Nutrition and Food Science*, 5, 275–279.
- Furr, H. C., & Clark, R. M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8, 364–377.
- García-Chavarría, M., & Lara-flores, M. (2013). The use of carotenoid in aquaculture. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 8(2), 38–49.
- Gomes, E., Dias, J., Silva, P., Valente, L., Empis, J., Gouveia, L., Bowen, J., & Young, A. (2002). Utilization of natural and synthetic sources of carotenoids in the skin pigmentation of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology*, 214, 287–293.
- Goodwin, T. W. (1984). The Biochemistry of Carotenoids. Vol. II, Chapman, London, UK.
- Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., & Gomes, E. (2002). Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquaculture Research*, 33, 987–993.
- Gouveia, L., & Empis, J. (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 227–233.
- Gouveia, L., Nobre, B. P., Marcelo, F. M., Mrejen, S., Cardoso, M. T., Palavra, A. F., & Mendes, R. L. (2007). Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry*, 101, 717–723.
- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 272, 55–75.

- Grigorakis, K. (2011). Effects of nutrition and aquaculture practise on fish quality. In: Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., & Wanasundara, U. Handbook of seafood quality, safety and health applications. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Chapter 7.
- Grigorakis, K., & Alexis, M. N. (2005). Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed different dietary regimes. *Aquaculture Nutrition*, 11, 341–344.
- Grigorakis, K., Alexis, M. N., Anthony Taylor, K. D., & Hole, M. (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 477–484.
- Grigorakis, K., Taylor, K. D. A, & Alexis, M. N. (2003). Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture*, 225, 109–119.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 600–609.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D., & Malcata, F. X. (2011). Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International*, 44, 2721–2729.
- Guillou, A., Choubert, G., & De La No:ue, J. (1992). Absorption and blood clearance of labelled carotenoids ($[^{14}\text{C}]$ astaxanthin, $[^3\text{H}]$ -Cantaxanthin and $[^3\text{H}]$ zeaxanthin) in mature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*, 103(2), 301-306.
- Ha, B.S., Kang, D.S., Kim, J.H., Choi, O.S. & Ryu, H.Y. (1993) Metabolismof dietary carotenoids and effects to improve the body color of cultured flounder and red sea bream. *Bulletin of Korean Fisheries Society*, 26, 91-101.
- Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zohar , Y., & Place, A. R. (2002). Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture*, 213, 347–362.
- Halver, J. E., & Hardy, R. W. (2002). Fish nutrition, 3rd Ed., Academic Press, San Diego.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1737–1746.
- Hertrampf, J. W., Piedad-Pascual, F. (2000). Handbook of ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. Chapter 2.
- Hossain, M. A. (2011). Fish as source of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which one is better-farmed or wild? *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(6), 455–466.
- Houlihan, D., Boujard, T., & Jobling, M (Ed.). (2001). Food intake in fish. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.*, N° 348, FAO, Rome.
- INE. (2014). Estatísticas da Pesca 2013. Instituto Nacional de Estatística, I.P., Lisboa.

- Izquierdo, M. S., Kalinowski, C. T., Thongrod, S., & Robaina, L. (2005). Nutritional needs for correct pigmentation in European red porgy (*Pagrus pagrus*). *Published online:2007*. 307–314.
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G., & Ginés, R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250, 431–444.
- Kalinowski, C. T., Izquierdo, M. S., Schuchardt, D., & Robaina, L. E. (2007). Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. *Aquaculture*, 272, 451–457.
- Kalinowski, C. T., Robaina, L. E., Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., & Izquierdo, M. S. (2005). Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*, 244, 223–231.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products quality implications. *Meat Science*, 36, 169–189.
- Katayama, T., Shintani, K. & Chichester, C. O. (1973). The biosynthesis of astaxanthin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 448, 253–257.
- Kaushik, S. J. Feed formulation, diet development and feed technology. *Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification*. Zaragoza : CIHEAM, 2000. p. 43-51 (Cahiers Options Méditerranéennes; n . 47)
- Kim, S. M., Shang, Y. F., & Um, B-H. (2011). A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography. *Phytochem. Anal.*, 22, 322–329.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106(21), 2747–2757.
- Lemahieu, C., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., Buyse, J., & Foubert, I. (2013). Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. *Food Chemistry*, 141, 4051–4059.
- Lepage, G. & Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27, 114 - 119.
- Lin, M. Q., Ushio, H., Ohshima, T., Yamanaka, H., & Koizumi, C. (1998). Skin color control of the red sea bream (*Pagrus major*). *Food Science and Technology, Lebensmittel-Wissenschaft- Technologie*, 31, 27–32.
- Lourenço, H. M., Afonso, C., Anacleto, P., Martins, M. F., Nunes, M. L., & Lino, A. R. (2012). Elemental composition of four farmed fish produced in Portugal. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(7), 853-859.
- Lugasi, A., Losada, V., Hóvári, J., Lebovics, V., Jakóczy, I., & Aubourg, S. (2007). Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 930-936.
- Maoka, T. (2011). Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*, 9, 278–293.
- Matos, E., Gonçalves, A., Bandarra, N., Colen, R., Nunes, M. L., Valente, L. M. P., Dinis, M. T., & Dias, J. (2012). Plant proteins and vegetable oil do not have detrimental effects on post-mortem muscle instrumental texture, sensory properties and nutritional value of gilthead seabream. *Aquaculture*, 358-359, 205–212.

- Matos, E., Silva, T. S., Wulff, T., Valente, L. M. P., Sousa, V., Sampaio, E., Gonçalves, A., Silva, J. M. G., Pinho, P. G., Dinis, M. T., Rodrigues, P. M., & Dias, J. (2013). Influence of supplemental maslinic acid (olive-derived triterpene) on the post-mortem muscle properties and quality traits of gilthead seabream. *Aquaculture*, 396-399, 146–155.
- Medina, I., Gallardo, J. M., & Aubourg, S. P. (2009). Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1467–1479.
- Meilgaard, M., Civille, G.V., & Carr, B.T. (1999). Sensory evaluation techniques. CRC Press LLC, 3rd edition, Florida, 387 p.
- Miller, M. R., Nichols, P. D., & Carter, C. G. (2008). n-3 Oil sources for use in aquaculture - alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutrition Research Reviews*, 21, 85–96.
- Minganti, V., Drava, G., De Pellegrini, R., & Siccardi, C. (2010). Trace elements in farmed and wild gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Marine Pollution Bulletin*, 60, 2022–2025.
- Mirón, A. S., Garcýá, M., Gómeza, A., Camachoa, F., Grima, E., & Chisti, Y. (2002). Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.*, 16, 287–297.
- Mnari, A., Bouhleb, I., Chraief, I., Hammami, M., Romdhane, M. S., El Cafsi, M., & Chaouch, A. (2007). Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Food Chemistry*, 100, 1393–1397.
- Moini, S., Khoshkhou, Z., & Matin, R. H. (2012). The fatty acids profile in Mackerel (*Scomberomorus guttatus*) and its shelf life in cold storage at -18 °C. *Global Veterinaria*, 8(6), 665–669.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12, 527–534.
- Nazemroaya, S., Sahari, M. A., & Rezaei, M. (2011). Identification of fatty acid in mackerel (*Scomberomorus commersoni*) and shark (*Carcharhinus dussumieri*) fillets and their changes during six month of frozen storage at -18 °C. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 553–566.
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., & Kawakami, Y. (1997). Proton-donatives antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42, 361–70.
- Nunes, M. L., Bandarra, N. M., & Batista, I. (2003). Fish products: contribution for a healthy food. *EJEAFChe.*, 2(4), 453-457.
- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I. M., Henahan, G., Nielsen, J., & Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 258–265.
- Orban, E., Navigato, T., Masci, M., Di Lena, G., Casini, I., Caproni, R., Gambelli, L., De Angelis, P., & Rampacci, M. (2007). Nutritional quality and safety of European perch (*Perca fluviatilis*) from three lakes of Central Italy. *Food Chemistry*, 100, 482–490.
- Osman, H., Suriah, A. R., & Law, E. C. (2001). Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chemistry*, 73, 55–60.
- Özogul, Y., Özogul, F., Kuley, E., Özkutuk, A. S., Gökbulut, C., & Köse, S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. *Food Chemistry*, 99, 752–758.

- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15, 1–9.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., & Divanach, P. (2006). A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: Preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. *Aquaculture*, 258, 211–219.
- Pavlidis, M., Karkana, M., Fanouraki, E. & Papandroulakis, N. (2008). Environmental control of skin color in the red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Res. Published online*: April 2008.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3), 547-557.
- Peng, J., Yuan, J-P., Wu, C-F., & Wang, J-H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar. Drugs*, 9, 1806-1828.
- Pérez-López, P., González-García, S., Allewaert, C., Verween, A., Murray, P., Feijoo, G., & Moreira, M. T. (2014). Environmental evaluation of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum*. *The Science of the Total Environment*, 466-467, 991–1002.
- Pirestani, S., Sahari, M. A., Barzegar, M., & Nikoopour, H. (2010). Lipid, cholesterol and fatty acid profile of some commercially important fish species from south caspian sea. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 886–895.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635–648.
- R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Ramalho, A., Colen, R., Gonçalves, A., Bandarra, N., Rema, P., Matos, E., Aires, T., Silva, T., Dias, J. (2014). Comparative formulation scenarios for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Performance, flesh quality, environmental loads, and cost effectiveness. In: Abstract Book Aquaculture Europe 14 – Adding Value, European Aquaculture Society/ AZTI-Tecnalia, San Sebastián: 329 – 330.
- Ramalho, A., Silva, J., Navalho, J., Dinis, M.T., Dias, J. (2014). Micro algal biomass (*Phaeodactylum tricornutum*) as a functional ingredient in gilthead seabream feeds. In: Abstract Book Aquaculture Europe 14 – Adding Value, European Aquaculture Society/ AZTI-Tecnalia, San Sebastián: 1045 – 1046.
- Reboloso-Fuentes, M. M., Navarro-Pérez, A., García-Camacho, F., Ramos-Miras, J. J., & Guil-Guerrero, J. L. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966–2972.
- Reis, A., Gouveia, L., Veloso, V., Fernandes, H. L., Empis, J. A., & Novais, J. M. (1996). Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalga *Phaeodactylum tricornutum* in a continuous-flow reactor. *Bioresource Technology*, 55, 83–88.
- Ribeiro, A. R., Gonçalves, A., Colen, R., Nunes, M. L., Dinis, M. T., & Dias, J. (2015). Dietary macroalgae is a natural and effective tool to fortify gilthead seabream fillets with iodine: Effects on growth, sensory quality and nutritional value. *Aquaculture*, 437, 51–59.
- Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S. E., & Balm, P. H. M. (2003). Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 223, 129–139.

- Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., & Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 8516–8522.
- Sahari, M. A., Farahani, F., Soleimanian, Y., & Javadi, A. (2014). Effect of frozen storage on fatty acid composition of the different tissues of four *scombrid* and one *dussumeriid* species. *Journal of Applied Ichthyology*, *30*, 381–391.
- Santinha, P. J. M. (1998). Dourada (*Sparus aurata*). In: Henriques, M. A. R. (Ed.). Manual de Aquacultura. Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, pp 165 – 176.
- Sargent, J.R., Henderson, R. J., & Tocher, D. R. 1989. The Lipids. In: Halver, H.E., (Ed.), Fish Nutrition. 2nd Edn., Academic Press, San Diego, CA, pp: 153-218.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A., & Bell, J. G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, *155*, 117–127.
- Schubring, R. (2009). Colour measurement. In: Fishery products: quality, safety and authenticity. Rehbein, H., Oehlenschläger, J., (Ed). Blackwell Publishing Ltd. Oxford; 127-172 pp.
- Senso, L., Suárez, M. D., Ruiz-Cara, T., & García-Gallego, M. (2006). On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, *101*, 298–307.
- Shahidi, F., Metusalach, & Brown, J. A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*(1), 1–67.
- Shang, Y. F., Kim, S. M., Lee, W. J., & Um, B. H. (2011). Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *J. Biosci. Bioeng.*, *111*, 237–241.
- Siew-Ling, H., Pooi-Yi, C., Kwan-Kit, W., & Ching-Lee, W. (2010). Stability studies of fucoxanthin from *Sargassum binderi*. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.*, *4*, 4580–4584.
- Silva, T. S., Matos, E., Cordeiro, O. D., Colen, R., Wulff, T., Sampaio, E., *et al.*, (2012). Dietary tools to modulate glycogen storage in gilthead seabream muscle: Glycerol supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 10613–10624.
- Šimat, V., Bogdanović, T., Poljak, V., & Petričević, S. (2015). Changes in fatty acid composition, atherogenic and thrombogenic health lipid indices and lipid stability of bogue (*Boops boops* Linnaeus, 1758) during storage on ice: Effect of fish farming activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, *40*, 120–125.
- Siron, R., Giusti, G., & Berland, B. (1989). Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, *55*, 95-100.
- Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S. & Manz, U. (1987) Carotenoids in diets for salmonids IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. *Aquaculture*, *65*, 279-292.
- Synowiecki, J., Shahidi, F., & Penney, R. W. (1993). Nutrient composition of meat and uptake of carotenoids by Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, *2*(3), 37–58.
- Tacon, A. G. J. (1987). The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual. 1-. The essential nutrients. Government cooperative programe. FAO, Brasília.

- Taelman, S. E., De Meester, S., Roef, L., Michiels, M., & Dewulf, J. (2013). The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: A life cycle perspective. *Bioresource Technology*, *150*, 513–522.
- Taheri, S., Motallebi, A. A., Fazlara, A., Aghababayan, A., & Aftabsavar, Y. (2012). Changes of fatty acid profiles in fillets of Cobia (*Rachycentron canadum*) during frozen storage. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *11*(1), 204–213.
- Tanaka, Y., Katayama, T., Simpson, K. L., & Chichester, C.O. (1976). The biosynthesis of astaxanthin-XX. The carotenoids in sea bream. *Chrysophrys major Termink and Schlegel. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, *42*, 1177-1182.
- Testi, S., Bonaldo, A., Gatta, P. P., & Badiani, A. (2006). Nutritional traits of dorsal and ventral fillets from three farmed fish species. *Food Chemistry*, *98*, 104–111.
- Torrissen, O. J. (1989). Pigmentation of salmonids: interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture*, *79*, 363–374.
- Torrissen, O. J., Hardy, R. W., Shearer, K. D., Scott, T. M., & Stone, F. E. (1990). Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficient for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *88*, 351–362.
- Turan, H., Sonmez, G., & Kaya, Y. (2007). Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black Sea. *Journal of Fisheries Sciences.com*, *1*(2), 97–103.
- Türkmen, A., Türkmen, M., Tepe, Y., & Akyurt, I. (2005). Heavy metals in three commercially valuable fish species from İskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. *Food Chemistry*, *91*, 167–172.
- Ulbricht, T.L., & Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, *338*, 985–992.
- Undeland, I., Stading, M., & Lingnert, H. (1998). Influence of skinning on lipid oxidation in different horizontal layers of Herring (*Clupea harengus*) during frozen storage. *J. Sci. Food. Agric.*, *78*, 441-450.
- Wassef, E. A., Chatzifotis, S., Sakr, E. M., & Saleh, N. E. (2010). Effect of two natural carotenoid sources in diet for gilthead seabream, *Sparus aurata*, on growth and skin coloration. *Journal of Applied Aquaculture*, *22*, 216–229.
- Watanabe, T., Kiron, V., & Satoh, S. (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, *151*, 185–207.
- Weihrauch, J. L., Posati, L. P., Anderson, B. A., & Exler, J. (1977). Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of food. *Journal of the American oil chemists society*, *54*, 36-40.
- Wu, D., & Sun, D. W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control - A review. *Trends in Food Science and Technology*, *29*(1), 5–20.
- Yan, X., Chuda, T., Suzuki, M., & Nagata, T. (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *63*, 605–607.
- Yildiz, M., Şener, E., & Timur, M. (2006). Effect of seasonal change and different commercial feeds on proximate composition of sea bream. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *6*, 99–104.
- Yu, P., & Gu, H. (2015). Bioactive substances from marine fishes, shrimps and algae and their functions: present and future. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*, 1114–1136.

Yuangsoi, B., Jintasataporn, O., Areechon, N., & Tabthipwon, P. (2010). The use of natural carotenoids and growth performance, skin pigmentation, and immune response in Fancy Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Aquaculture*, 22, 267–283.

Zenebon, O., Pascuet, N. S., & Tiglia. P. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4 edição, 1ª Edição Digital. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008, Capítulo VI.