

***Otimização da extração de porfirano para aplicação em filmes
edíveis para o desenvolvimento de embalagens de produtos
alimentares: Avaliação do seu potencial bioativo e das
propriedades mecânicas***

Marco Pontes Moura Teles

2021

***Otimização da extração de porfirano para aplicação em filmes
edíveis para o desenvolvimento de embalagens de produtos
alimentares: Avaliação do seu potencial bioativo e das
propriedades mecânicas***

Marco Pontes Moura Teles

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

Dissertação sob a orientação de Professora Doutora Susana Bernardino e coorientação de
Professora Doutora Clélia Afonso

2021

Título: Otimização da extração de porfirano para aplicação em filmes edíveis para o desenvolvimento de embalagens de produtos alimentares: Avaliação do seu potencial bioativo e das propriedades mecânicas

Copyright © Marco Pontes Moura Teles

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2021

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

A produção desta dissertação levou ao desenvolvimento de publicações e apresentações em eventos internacionais:

Participação e apresentação oral “*Antioxidant capacity evaluation of porphyran extracted from Porphyra dioica: incorporation in films for food packaging*” na conferência: *1st International Conference on Water Energy Food and Sustainability (ICoWEFS 2021)*. Resultando na publicação: “*Antioxidant Capacity Evaluation of Porphyran Extracted from Porphyra dioica: Incorporation in Films for Food Packaging*”, Marco Teles, Pedro Adão, Raul Bernardino, Clélia Afonso, Susana Bernardino. *Proceedings of the 1st International Conference on Water Energy Food and Sustainability (ICoWEFS 2021)*, ed. João Rafael da Costa Sanches Galvão, Paulo Sérgio Duque de Brito, Filipe dos Santos Neves, Flávio Gabriel da Silva Craveiro, Henrique de Amorim Almeida, Joel Oliveira Correia Vasco, Luís Miguel Pires Neves, Ricardo de Jesus Gomes, Sandra de Jesus Martins Mourato, Vânia Sofia Santos Ribeiro, 2021, p. 201-209, DOI: 10.1007/978-3-030-75315-3_24.

Artigo publicado a 26 de janeiro de 2022: “*Development and characterization of films for food application incorporating porphyran extracted from Porphyra dioica*” Marco Teles, Pedro Adão, Clélia Afonso, Raul Bernardino, Mafalda Guedes, Ricardo Baptista, Susana Bernardino, 2022, *Coatings 12*(2), 148. DOI: 10.3390/coatings12020148.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Professora Doutora Susana Bernardino por toda a dedicação demonstrada e inspiração para o desenvolvimento de um trabalho sempre melhor, indicando e demonstrando sempre o caminho correto. À Professora Doutora Clélia Afonso pelas leituras e análises sempre sérias e indispensáveis que resultaram em novas perspectivas que agregaram sempre grande valor. E ao Doutor Pedro Adão por toda a ajuda, explicações e dúvidas sanadas, com uma disponibilidade diária. Agradecer ainda ao CETEMARES e a todos que lá trabalham diariamente por demonstrarem sempre o que é trabalho árduo e dedicação, e o que esse esforço pode gerar.

Agradecer à minha família. Primeiramente, aos meus pais, por me demonstrarem o que é a determinação, o cuidado e confiança, não só durante esta dissertação, mas como em todo o percurso académico e em toda a minha vida. Ao meu irmão, por demonstrar que, mesmo nas fases mais complicadas, no final tudo fica bem, se trabalharmos nisso. Aos meus tios por estarem sempre presentes e não me deixarem esquecer que a vida tem de ter equilíbrio e não pode ser só trabalho. Aos meus avós, por demonstrarem sempre muito carinho, mesmo à distância, a importância de querer saber sempre mais e de sorrir mesmo quando é difícil.

Agradecer aos meus amigos, pois conheci e convivi com pessoas incríveis, algumas de forma diária. Desde a motivação e a ajuda para desenvolver ensaios, às horas e dias de trabalho, que só foram possíveis por não estar sozinho na maioria das vezes, aos comentários engraçados e cafés na varanda, que variavam entre brincadeiras aleatórias e discussões produtivas. Agradeço também aos meus amigos, os quais passei a ver e falar menos por circunstância da vida, mas que tiveram grande influência para conseguir percorrer todo este percurso.

Resumo

O plástico não-biodegradável é amplamente utilizado e representa um dos maiores problemas ambientais da atualidade, com perspectiva do seu agravamento. Existe, portanto, a necessidade urgente de desenvolver alternativas sustentáveis e renováveis, com baixo impacto ambiental, sendo a alternativa mais viável o desenvolvimento de materiais semelhantes ao plástico a partir de polímeros biodegradáveis, como os polissacarídeos sulfatados, por exemplo o porfirano.

A viabilidade passa pela obtenção a partir da matéria-prima de forma sustentável ambientalmente e economicamente, sendo necessário o máximo rendimento com os mínimos recursos. O processo desenvolvido de extração de porfirano semi-refinado de *Porphyra dioica*, PorfP2, permite, a partir da utilização de um solvente verde (água quente), um elevado rendimento de extração de porfirano semi-refinado, $26,66 \pm 0,27\%$, reprodutível e com baixa contaminação, sendo o principal contaminante provavelmente fenóis da parede celular da alga, $0,616 \pm 0,027$ eq. de ácido gálico $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato. O porfirano semi-refinado obtido apresentou potencial antioxidante em todos os ensaios realizados, *Hydrogen peroxide scavenging assay* (HPSA) após 10 e 15 minutos ($\Delta 0,066 \pm 0,002$ e $\Delta 0,072 \pm 0,003$ respectivamente), Ensaio do reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) em metanol e em acetonitrilo ($2,23 \pm 0,78\%$ e $10,36 \pm 1,36\%$ respectivamente), *Ferric-reducing antioxidant power* (FRAP) ($0,420 \pm 0,014$ eq. ácido ascórbico $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato) e Ensaio do reagente 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) ($20,46 \pm 0,90\%$). No entanto, não apresentou potencial antimicrobiano. No desenvolvimento dos filmes, devido à dificuldade de desenvolver matrizes viáveis apenas com porfirano e glicerol (Gli), foram desenvolvidas estruturas compósitas com a adição de pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC) e alginato de sódio (AL). Os componentes não demonstraram bioatividades, com exceção do PcT em HPSA com atividades a 10 e 15 minutos ($\Delta 0,019 \pm 0,002$ e $\Delta 0,033 \pm 0,002$). Nos filmes, as propriedades antioxidantes mais ressaltadas foram do porfirano semi-refinado nos ensaios de DPPH, FRAP e ABTS e de PcT (PorfP2_PcT e PorfP2_PcT_Gli) no ensaio HPSA, porém em nenhuma das soluções filmogênicas foram detetadas propriedades antimicrobianas para os microrganismos

testados, *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*. Morfológicamente ao microscópio eletrônico a maioria dos filmes apresentaram superfícies relativamente homogêneas e com poucas rugosidades, com exceção do filme PorfP2_CMC_Gli, que apresentou a formação de duas fases heterogêneas. O filme que apresentou as melhores propriedades mecânicas com a melhor conjugação módulo de Young ($1629,00 \pm 142,41$ MPa) e tensão de ruptura ($23,18 \pm 1,62$ MPa), foi o filme PorfP2_PcT_Gli. Os filmes testados como embalagens (PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_CMC_Gli e PorfP2_AL_Gli) foram capazes de condicionar bolas de cereais com chocolate por 2 meses, de modo a manter a qualidade de forma equiparada ao plástico, ficando a diferença sensorialmente imperceptível.

No procedimento de obtenção de porfirano semi-refinado é viável e reproduzível e os filmes desenvolvidos, principalmente o PorfP2_PcT_Gli, demonstraram-se boas alternativas e possíveis candidatos como substitutos de plásticos não-biodegradáveis, apesar da necessidade de ensaios adicionais.

Palavras-Chave: Materiais Compósitos; Plástico Biodegradável; Polissacarídeos; Porfirano; *Porphyra dioica*.

Abstract

Non-biodegradable plastic is widely used and represents one of the biggest environmental problems of our time, with the prospect of its worsening. There is, therefore, an urgent need to develop sustainable and renewable alternatives, with low environmental impact, being the most viable alternative the development of plastic-like materials from biodegradable polymers such as sulfated polysaccharides, for example, porphyran.

The viability involves obtaining the raw material in an environmentally and economically sustainable way, requiring maximum yield with minimal resources. The developed process of extracting semi-refined porphyrin from *Porphyra dioica*, PorfP2, allows, from the use of a green solvent (hot water), a high yield of semi-refined porphyran extraction, $26.66 \pm 0.27\%$, reproducible and with low contamination, being the main contaminant probably phenols from the algae cell wall, 0.616 ± 0.027 eq. of gallic acid $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of extract. The obtained semi-refined porphyran showed antioxidant potential in all assays performed, Hydrogen peroxide scavenging assay (HPSA) after 10 and 15 minutes ($\Delta 0.066 \pm 0.002$ and $\Delta 0.072 \pm 0.003$ respectively), 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Reagent Assay (DPPH) in methanol and acetonitrile ($2.23 \pm 0.78\%$ and $10.36 \pm 1.36\%$ respectively), Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) (0.420 ± 0.014 eq. ascorbic acid $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of extract) and 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) Reagent Assay (ABTS) ($20.46 \pm 0.90\%$), however, did not show antimicrobial potential. In the development of the films, due to the difficulty of developing viable matrices only with porphyran and glycerol (Gli), composite structures were developed with the addition of industrial food pectin (PcT), sodium carboxymethylcellulose (CMC) and sodium alginate (AL). The components showed no bioactivities, except for PcT in HPSA with activities at 10 and 15 minutes ($\Delta 0.019 \pm 0.002$ and $\Delta 0.033 \pm 0.002$). In the films, the most highlighted antioxidant properties were of semi-refined porphyran in the DPPH, FRAP and ABTS assays and of PcT (PorfP2_PcT and PorfP2_PcT_Gli) in HPSA assay, but in none of the filmogenic solutions antimicrobial properties were detected for the microorganisms tested, *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *C. albicans*. Morphologically, under the electron microscope, most of the films showed relatively homogeneous surfaces and few roughness, except for the

PorfP2_CMC_Gli film, which showed the formation of two heterogeneous phases. The film that presented the best mechanical properties with the best conjugation of Young's modulus (1629.00 ± 142.41 MPa) and breaking strength (23.18 ± 1.62 MPa) was the PorfP2_PcT_Gli film.

The procedure for obtaining semi-refined porphyran is viable and reproducible and the films developed, mainly PorfP2_PcT_Gli, proved to be good alternatives and possible candidates with substitutes for non-biodegradable plastics, despite the need for additional tests.

Keywords: Biodegradable Plastic; Composite Materials; Polysaccharides; Porphyran; *Porphyra dioica*.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Plástico de origem fóssil.....	1
1.2. Plástico Biodegradável	4
1.3. Revestimentos e Filmes	6
1.3.1. Compósitos.....	10
1.4. Polissacarídeos Sulfatados.....	12
1.5. <i>Porphyra</i>	14
1.5.1. <i>Porphyra dioica</i>	15
1.6. Porfirano	17
1.6.1. Bioatividades do Porfirano.....	18
1.7. Métodos de Extração de Polissacarídeos.....	19
1.8. Objetivo	21
1.8.1. Geral	21
1.8.2. Específicos	21
2. Métodos.....	22
2.1. Otimização da Extração de Porfirano de <i>Porphyra dioica</i>	22
2.2. Métodos de Quantificação Colorimétricos	23
2.2.1. <i>p</i> -Benzoquinona (<i>p</i> -BQ).....	24
2.2.2. Fenol Sulfúrico.....	25
2.2.3. Quantificação total de fenóis (TPC).....	27
2.2.4. <i>Hydrogen peroxide scavenging assay</i> (HPSA)	28
2.2.5. Ensaio do reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	29
2.2.6. <i>Ferric-reducing antioxidant power</i> (FRAP)	31
2.2.7. Ensaio do reagente 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) 33	

2.3.	Antibiogramas.....	34
2.4.	Formação dos Filmes	35
2.5.	Ensaio Morfológicos e Mecânicos	37
2.5.1.	Caracterização morfológica.....	37
2.5.2.	Ensaio Mecânicos	38
2.6.	Ensaio Sensoriais.....	38
2.7.	Tratamento estatístico	39
3.	Resultados e Discussão	40
3.1.	Extração	40
3.2.	Composição dos filmes	47
3.2.1.	Avaliação da capacidade Antioxidante dos componentes dos filmes	47
3.2.2.	Antibiogramas dos componentes dos filmes	51
3.3.	Filmes.....	52
3.3.1.	Avaliação da capacidade Antioxidante dos filmes	52
3.3.2.	Antibiogramas das soluções filmogénicas.....	56
3.3.3.	Propriedades morfológicas dos filmes.....	57
3.3.4.	Propriedades mecânicas dos filmes	59
3.3.5.	Ensaio sensoriais	61
4.	Conclusão	62
5.	Referências.....	64
	Anexos.....	80

Índice de Figuras

Figura 1. 1 – Distribuição do plástico pelos setores de mercado em 2019 na Europa, adaptado de PlasticsEurope (2020).....	2
Figura 1. 2 – Fotografias reais do impacto da poluição por resíduos plásticos no oceano e praias, imagens com licença comercial padrão de Adobe Stock.....	3
Figura 1. 3 – Esquematização das metodologias de formulação de filmes e revestimentos aplicados à indústria alimentar, adaptados de Wang et al. (2018).	9
Figura 1. 4 – Filmes com bioatividades por incorporação de agentes bioativos ao polímero (A), aplicação da formulação layer-by-layer com substrato e fase ativa (B) e formulação de filmes com polímeros bioativos (C), adaptado de Halonen et al. (2020).....	10
Figura 1. 5 – <i>Porphyra dioica</i> J. Brodie & L. M. Irvine 1997, fontes AlgaeBase (© Ignacio Bárbara e ©Michael Guiry).....	15
Figura 1. 6 – Estrutura do Porfirano, adaptado de Rhein-Knudsen et al. (2015).....	18
Figura 2. 1 – Fluxograma do procedimento de extração de porfirano semi-refinado a partir de <i>Porphyra dioica</i> desenvolvido.	23
Figura 2. 2 – Fluxograma dos procedimentos e análises aplicados sequencialmente.....	39
Figura 3. 1 – Espectro de absorvância em UV-Visível entre 200 e 800 nm em células de quartzo (percurso ótico de 1 cm) dos extratos a 0,6 mg.mL ⁻¹ extraídos pelos procedimentos PorfP1 (descarte das duas primeiras horas) e PorfP2 (descarte da primeira hora).	42
Figura 3. 2 – Espectro de absorvância em UV-Visível entre 200 e 800 nm em células de quartzo (percurso ótico de 1 cm) das frações 7h1F e 7h2F, duas primeiras frações de sete horas após a fração descartada, das amostras PorfP2S1, PorfP2S2 e PorfP2S4.....	43
Figura 3. 3 – Composição dos extratos obtidos pelo processo PorfP2 analisados nas amostras S1, S2 e S4, em termos de concentração de D-galactose (%) (A), e quantificação total de fenóis (equivalentes de ácido gálico µg.mg ⁻¹ de extrato) (B). Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.	43
Figura 3. 4 – Variação da absorvância a 524 nm através do ensaio HPSA após 10 minutos (esquerda) e 15 minutos (direita) em meio reacional contendo 0,6 mg.mL ⁻¹ de extratos das amostras S1, S2 e S4 extraídos pelo processo PorfP2. Letras minúsculas na zona superior	

das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.
..... 45

Figura 3. 5 – Ensaio da potencial antioxidante por DPPH diluído em metanol (A), DPPH diluído em acetonitrilo (B), FRAP (C) e ABTS (D) dos extratos PorfP2S1, PorfP2S2 e PorfP2S4, amostras do procedimento PorfP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%. 46

Figura 3. 6 – Variação da absorvância a 524 nm através do ensaio HPSA após 10 minutos (esquerda) e 15 minutos (direita) em meio reacional contendo pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC), alginato de sódio (AL), glicerol 86-88% (Gli) a $1,2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e porfirano semi-refinado extraído pelo processo PorfP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%. 49

Figura 3. 7 – Ensaio da potencial antioxidante por DPPH diluído em metanol (A), DPPH diluído em acetonitrilo (B), FRAP (C) e ABTS (D) de pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC), alginato de sódio (AL), glicerol 86-88% (Gli) a $1,2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e porfirano semi-refinado extraído pelo processo PorfP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%. 50

Figura 3. 8 – Variação da absorvância a 524 nm através do ensaio HPSA após 10 minutos (cima) e 15 minutos (baixo) em meio reacional contendo amostras dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e porfirano semi-refinado. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%. 53

Figura 3. 9 – Ensaio da potencial antioxidante por DPPH diluído em metanol (A), DPPH diluído em acetonitrilo (B), FRAP (C) e ABTS (D) de amostra dissolvida em água destilada dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado,

carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli). Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%. 55

Figura 3. 10 – Imagens de microcopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes de a) porfirano semi-refinado (PorfP2), b) porfirano semi-refinado e glicerol 86-88% (PorfP2_Gli), c) porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), d) porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), e) porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), f) porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), g) porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL) e h) porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli). 57

Figura 3. 11 – Imagens SEM: (a) detalhe da estrutura em camadas sobrepostas em PorfP2_Gli; (b) estrutura bifásica em PorfP2_CMC_Gli. 58

Figura 3. 12 – Caracterização morfológica dos filmes produzidos; (A) valor médio de rugosidade (Ra) superficial; (B) espessura média. 59

Figura 3. 13 – Ensaio das propriedades mecânicas de tensão de rotura (A) e módulo de Young (B) dos filmes de porfirano semi-refinado (PorfP2), porfirano semi-refinado e glicerol 86-88% (PorfP2_Gli), porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli). Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%. 60

Figura 3. 14 – Número de respostas corretas na diferenciação através de análise sensorial de bolas de cereais com chocolate embalados nos filmes de porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e em polipropileno (controle). 61

Figura A 1 – Boletins de respostas das provas sensoriais por ensaio triangular das bolas de cereais com chocolate embalados nas embalagens formadas pelos filmes PorfP2_PcT_Gli; PorfP2_CMC_Gli e PorfP2_AL_Gli.....	84
Figura A 2 – Imagens da estrutura dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL) e porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_AL_Gli) a partir de microscopia eletrónica de varrimento por emissão de campo com ampliação de 100 e 1000 vezes.	86
Figura A 3 – Cereais com chocolate embalados em embalagem produzidas a partir dos filmes de porfirano semi-refinado, pectina e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_AL_Gli) e em polietileno (Controlo).	87

Índice de Tabelas

Tabela 2. 1 – Composição das soluções filmogénicas pelos componentes porfirano semi-refinado extraído pelo método 2 (PorfP2), carboximetilcelulose de sódio (CMC), pectina (PcT), alginato de sódio (AL) e glicerol (Gli).....	36
Tabela 3. 1 – Rendimento obtido a partir de 15 g de <i>Porphira dioica</i> em pó pelos processos PorfP1 (extrações com extrator <i>Soxhlet</i> com descarte da fração das duas primeiras horas de extração, 2h1F, seguida de frações consecutivas de sete horas, 7h1F, 7h2F, 7h3F, 7h4F) e PorfP2 (extrações com extrator <i>Soxhlet</i> com descarte da fração da primeira hora de extração, 1h1F, seguida de frações consecutivas de sete horas, 7h1F, 7h2F, 7h3F, 7h4F).....	41
Tabela 3. 2 – Caracterização dos principais componentes presentes nos extratos obtidos pelo processo de extração PorfP2 das amostras S1, S2 e S4, sendo consideradas as frações 7h1F e 7h2F.....	43
Tabela 3. 3 – Comprimento do diâmetro dos halos (mm) de inibição do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> por 30 µg de cloranfenicol em bactéria e 25 µg de fluconazol em fungos (Controlo Positivo), 200 µg de extratos das amostras S1, S2 e S4 extraídos pelo processo PorfP2), pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC) e alginato de sódio (AL).....	51
Tabela 3. 4 – Comprimento do diâmetro dos halos (mm) de inibição do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> por 30 µg de cloranfenicol em bactéria e 25 µg de fluconazol em fungos (Controlo Positivo), 200 µg de amostra dissolvida em água Milli-Q® dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli).	56
Tabela A 1 – Composição das soluções filmogénicas preliminares pelos componentes porfirano semi-refinado extraído pelo método 2 (PorfP2), carboximetilcelulose de sódio	

(CMC), pectina (PcT), alginato de sódio (AL), glicerol (Gli) e cloreto de cálcio (CaCl₂).
 *Filmes selecionados para os ensaios de bioatividades, presentes na Tabela 2.1 80

Tabela A 2 – Composição bioquímica e bioatividades dos extratos PorfP2S1, PorfP2S2, PorfP2S4, dos restantes componentes, pectina alimentar (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC), alginato de sódio (AL) e glicerol 86-88% (Gli), e dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL) e porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), e rendimento das amostras de PorfP2S1, PorfP2S2, PorfP2S4, PorfP2S5, PorfP2S6, PorfP2S7 e PorfP2S8 considerando as frações 7h1F e 7h2F..... 82

Tabela A 3 – Número de respostas corretas na diferenciação através de análise sensorial de bolas de cereais com chocolate embalados nos filmes de porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e em polipropileno (controlo). 83

Lista de Abreviaturas e siglas

E – Módulo de Young

p -BQ – Benzoquin-1,4-ona ($C_6H_4O_2$)

Abs – Absorvância

ABTS – 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) ($C_{18}H_{24}N_6O_6S$)

AL – Alginato de sódio

BHT – Hidroxitolueno butilado

CMC – Carboximetilcelulose de sódio

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)

Fração $xhyF$ – Fração extraída em x horas, y ordem da fração extraída em x horas

FRAP – *Ferric-reducing antioxidant power*

Gli – Glicerol 86-88%

HPSA – *Hydrogen peroxide scavenging assay*

IFN- γ – Interferão-gama

IgE – Imunoglobulina E

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

MAA – *Mycosporine-like amino acid*

mbar – Milibar

MD-2 – Fator de diferenciação mieloide 2

MHA – *Muller Hinton Agar*

NF- κ B – Fator nuclear *kappa* B

PCL – Policaprolactona

PcT – Pectina alimentar industrial

PHB – Polihidroxibutirato

PHA – Polihidroxialcanoato

PLA – Ácido polilático

PorfP2 – Porfirano semi-refinado extraído pelo processo 2

PorfPxSy – Porfirano semi-refinado, processo x , amostra de extração y

PorfPxSy_zhwF – Fração de Porfirano semi-refinado, processo x , amostra de extração y , em z horas, na ordem w

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados

PSB – Polibutileno succinato

Ra – Rugosidade média

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento

TF – Tampão fosfato 0,08 M

TNF- α – Fatores de necrose tumoral *alfa*

TPC – Quantificação total de fenóis

TPS – Amido termoplástico

UMY – *Universal Medium for Yeasts*

1. Introdução

1.1. Plástico de origem fóssil

O plástico petroquímico é um composto antropogénico. Os seus resíduos constituem um dos maiores problemas ambientais da atualidade, pelo facto de serem virtualmente não-biodegradáveis (Yeo et al., 2017). Desta forma, desde a sua invenção em 1862 (Ramadas et al., 2009) e, posteriormente, a sua produção mundial em 1950, até hoje nenhum resíduo foi degradado de forma natural, permanecendo no ambiente, contaminando ecossistemas e interagindo de forma negativa com os organismos (Geyer et al., 2017). As principais características responsáveis pela elevada resistência dos plásticos à biodegradação, incluem a estrutura polimérica de cadeia longa, o alto peso molecular, a falta de um grupo funcional suscetível à degradação microbiana, a hidrofobicidade e a cristalinidade (Urbanek et al., 2018).

O Parlamento Europeu já identificou e considerou as embalagens de produtos alimentares como um dos resíduos que mais frequentemente são encontrados nas praias europeias. Existiram tentativas de reverter este facto. As mesmas datam desde 20 dezembro 1994, com a diretiva europeia 94/62/EC, que visa a redução de descarte de plástico e um aumento da sua reutilização e reciclagem, até às estratégias atuais como o acordo COM/2019/640. Esta visa em especial a ação “Estratégia industrial para a economia circular e limpa”, que apresenta como um dos objetivos o uso exclusivo de embalagens reutilizáveis ou recicláveis até 2030 e descreve estratégias da diminuição da utilização e descarte de plástico, associadas ao desperdício zero. A comissão europeia promove a economia circular, nomeadamente através de incentivos à reutilização e reciclagem e posterior prolongamento da vida útil de todos os materiais. Esta promoção abrange conferências como a: *“Impacts of the circular economy transition in Europe – Circular Impacts final conference”*.

Devido à sua utilização cada vez mais alargada, houve um aumento de 20 vezes na escala da produção de plástico, ao longo de cinco décadas, desde 1964, já superior a 300 milhões de toneladas por ano, atingindo 335 milhões de toneladas em 2015 (Urbanek et al., 2018). Prevê-se ainda que a produção de plásticos deverá duplicar até 2038 e quase quadruplicar até 2050 (World Economic Forum, Ellen MacArthur Foundation e McKinsey & Company, 2016). Estima-se que todos os anos, 10 a 20 milhões de toneladas de plástico tenham como destino os oceanos (UNEP, 2014). O sector com maior consumo é o da produção de embalagens (Figura 1.1), com especial relevância para a indústria alimentar, maioritariamente compostos por polietileno de baixa e de alta densidade, polipropileno e politereftalato de etileno, compostos derivados do petróleo e não-biodegradáveis, sendo o continente europeu o terceiro maior produtor, 16%, (PlasticsEurope, 2020).

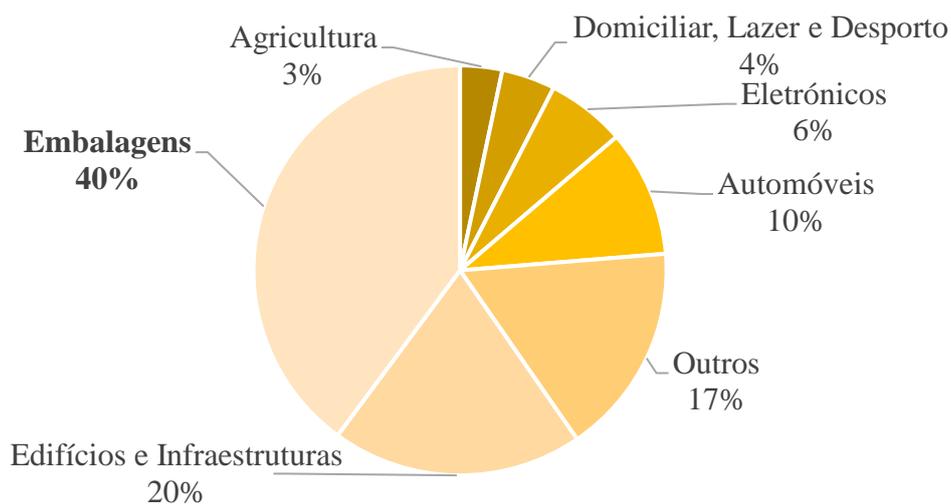


Figura 1. 1 – Distribuição do plástico pelos setores de mercado em 2019 na Europa, adaptado de PlasticsEurope (2020).

Os detritos plásticos apresentam-se como uma ameaça à vida marinha, os estudos realizados sobre o impacto deste tipo de resíduos demonstram que a poluição do meio marinho por plástico é um problema ambiental crescente e que ocorre à escala global (Balestri et al., 2017; Derraik, 2002). As correntes marítimas e outros movimentos de massas de água transportam os resíduos a quilómetros de distância e levam à sua acumulação em determinadas zonas do globo, que sofrem com impactos ainda mais acentuados (Cózar et al., 2015). Algumas consequências destas contaminações são facilmente visíveis e podem ser

fatais, para diversos seres. As principais ameaças são a ingestão, levando a obstrução das vias do sistema digestivo e/ou respiratório, e emaranhamento em detritos plásticos, como linhas e cordas sintéticas, reduzindo ou impossibilitando a locomoção e o crescimento do organismo, (Figura 1.2) (Mucientes & Queiroz, 2019).



Figura 1. 2 – Fotografias reais do impacto da poluição por resíduos plásticos no oceano e praias, imagens com licença comercial padrão de Adobe Stock®.

A recolha de plástico do meio marinho apresenta-se como um problema logístico de grande escala. Embora a recolha, reutilização e ou reciclagem dos resíduos fosse teoricamente possível, a proporção e distribuição dos mesmos tornam o processo complexo. Aos problemas referidos acresce o desgaste que os macrolásticos sofrem no meio aquático, pois, quando são sujeitos a fatores abióticos (radiação ultravioleta, temperatura, *stress* físico, etc.), ocorre uma fragmentação dos resíduos em partículas microscópicas, facilitando a sua distribuição pela coluna de água e impossibilitando a sua deteção e recolha em grande escala (Urbanek et al., 2018). Estas partículas podem provocar graves problemas pois ao serem introduzidas na cadeia alimentar afetam todos os níveis tróficos uma vez que estes resíduos, além de tóxicos, são bioacumuláveis (Farrell & Nelson, 2013) e os efeitos associados ao contacto direto com os organismos, podem provocar erupções e irritação cutânea, além de todos os possíveis problemas desconhecidos ou ainda não associados (Alimba & Faggio, 2019; Feng et al., 2020). Todos estes fatores devem ser analisados e tidos em consideração, pois podem afetar muitos organismos, inclusivamente o ser humano. Uma vez entrando na cadeia alimentar, o ser humano acaba por incluir estas partículas na sua dieta, que apresentam uma elevada toxicidade, e sendo sensível, em alguns casos, ao contacto cutâneo, podendo apresentar os problemas já referidos (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014; Wright & Kelly, 2017).

A redução do descarte, através da restrição da utilização, reutilização e reciclagem das embalagens de plástico, assim como a recolha do plástico já existente no meio ambiente, de forma eficaz, exige uma articulação e ação coordenada a nível internacional e governamental devido ao carácter global, à dimensão e à dificuldade da aplicação de operações com impacções significativas (Dauvergne, 2018). A utilização de recursos naturais e produção de materiais, de forma responsável, assim como a reutilização, reciclagem e descarte consciente é o 12º Objetivo de Desenvolvimento Sustentável denominado Consumo e produção responsáveis do Departamento de Assuntos Económicos e Sociais de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas. No entanto, o aumento da área das regiões de acumulação de resíduos de plástico, devido às correntes marítimas, como os “Continentes de Plástico”, são claras evidências da insuficiência das medidas (Albeck-Ripka, 2018).

1.2. Plástico Biodegradável

O estabelecimento de uma economia verde depende de múltiplos fatores como: a redução da utilização de recursos energéticos, a minimização da produção de resíduos durante os processos de produção e posterior otimização dos mesmos, da prevenção da poluição ambiental especialmente compostos perigosos, e da limitação dos desperdícios, dando preferência à reutilização e reciclagem (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017).

O plástico desempenha hoje um papel de destaque enquanto material, estando presentes em todo o tipo de indústrias e processos quotidianos. As suas inúmeras aplicabilidades, devem-se às suas características e propriedades físicas e mecânicas inerentes. O baixo custo de produção, associado à facilidade de manufatura, torna o processo industrial de produção mais apelativo a nível económico. A estas características juntam-se propriedades como a elasticidade, a ductilidade, a densidade reduzida e a resistência não só a choques mecânicos, mas também à ação de agentes químicos e à água que garantem um produto duradouro e estável, não sujeito a alterações na pós-produção (Brandsch & Piringer, 2008). No entanto, a sua durabilidade e origem torna o mesmo uma ameaça aos ecossistemas, sendo urgente o desenvolvimento de substitutos que mantenham todas as outras

propriedades, mas que diminuem grandemente o impacto ambiental que advêm da permanência e produção deste material (Iwata, 2015).

Os plásticos biodegradáveis apresentam-se como os principais candidatos na resolução deste problema, sendo os mesmos compostos por polímeros de origem biológica ou sintética que podem ser degradados por organismos em componentes a reintegrar no ecossistema, idealmente sem provocar danos (Shen et al., 2020).

Numa primeira abordagem é necessário clarificar o conceito de plástico biodegradável, pois o que o distingue de um plástico comum é o intervalo de tempo da sua decomposição e o agente responsável pela mesma (Shah et al., 2008). Os bioplásticos, polímeros desenvolvidos a partir de biomassa, apesar da matéria-prima de que são formados, não são necessariamente biodegradáveis. A degradação destes bioplásticos depende do material utilizado na sua preparação, dos processos utilizados na sua formação e da sua estrutura final (Iwata, 2015). Desta forma, é necessário distinguir biodegradabilidade, capacidade de um microrganismo utilizar determinado material como fonte de carbono; e biodegradação, um processo mensurável que consiste na degradação de uma substância por um ou mais organismos, em determinadas condições físicas e químicas, num intervalo de tempo definido. Os conceitos são relacionáveis, na medida em que a determinação da biodegradabilidade de um material vai ser associada à sua biodegradação (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). O processo de biodegradação deve incluir a conversão total do material, num determinado intervalo de tempo, em condições aeróbias, em produtos como água, dióxido de carbono, sais minerais e biomassa ou em condições anaeróbias em metanol e/ou ácidos com baixo peso molecular, como o ácido láctico ou outros compostos inorgânicos, completando assim um ciclo de renovação total (Chinaglia et al., 2018; Harrison et al., 2018; Peelman et al., 2013).

Alguns polímeros biodegradáveis já são produzidos e utilizados, como por exemplo, o polihidroxialcanoato (PHA), um hidrato de carbono produzido por algumas bactérias como forma de armazenamento de energia, e que apresenta propriedades físicas semelhantes ao polipropileno e polietileno (Lambert & Wagner, 2017). Outros exemplos são o ácido

polilático (PLA), semelhante ao poliestireno e polietileno teraftalato, o amido termoplástico (TPS), o polibutileno succinato (PSB) e a policaprolactona (PCL) (Lambert & Wagner, 2017). No entanto, apenas o polihidroxibutirato (PHB), um tipo de PHA, e o TPS foram degradados em todos os 7 testes para a avaliação da biodegradação de correspondência ao padrão internacional (Narancic et al., 2018).

1.3. Revestimentos e Filmes

Durante a produção, transporte, processamento, armazenamento e comercialização ocorre a perda da integridade dos alimentos, devido principalmente à deterioração química e microbiológica, resultando na perda de qualidade dos produtos que podem até mesmo gerar perturbações à saúde do consumidor, como intoxicação alimentar (Kirsh et al., 2020). O escurecimento da fruta e certos vegetais é um processo enzimático natural, caracterizado pela oxidação de compostos fenólicos, que embora seja despontado na presença de oxigénio, ocorre preferencialmente à temperatura ambiente ou superior (Yadav et al., 2017), e meios ácidos também contribuem para uma maior oxidação (Lupetti et al., 2005).

Assim, as embalagens devem estabelecer uma barreira física conferindo proteção contra as principais influências externas que aceleram a degradação dos alimentos, tais como: agentes químicos, gases como oxigénio, dióxido de carbono e vapor de água, humidade, e outros compostos que possam entrar em contacto com o alimento. A proteção física ocorre devido à diminuição de danos causados por forças mecânicas, como embates e vibrações durante o transporte. A embalagem confere ainda proteção contra agentes biológicos, como microrganismos e insetos (Marsh & Bugusu, 2007; Ozen & Floros, 2001).

Os filmes e revestimentos diferenciam-se, sendo os filmes uma estrutura sólida independente que pode ser colocada e facilmente removida sobre os alimentos e os revestimentos são apostos, sendo colocados ainda no estado líquido sobre o alimento e após a sua solidificação tornam-se indissociáveis sem que sejam desfeitos (Pinheiro et al., 2010). As características físicas da embalagem ou revestimento, como a rigidez, flexibilidade ou

cor, devem ser adaptadas conforme as necessidade do alimento a que se aplica e o tipo de transporte a que será sujeito (Raheem, 2013). Com a aplicação de filmes e revestimentos é necessário avaliar a alteração de parâmetros sensoriais do alimento, nomeadamente o sabor, pois este fator não deve sofrer alterações especialmente em aplicações de revestimentos edíveis (Reboleira et al., 2020).

As propriedades mecânicas dos filmes são definidas por: tipo de matéria-prima, processo de formação, aditivos utilizados e aplicação final no alimento (Ramos et al., 2012). Na formulação da matriz do filme, existem inúmeros fatores que influenciam a sua formação, como os parâmetros físicos e químicos da solução filogénica, que devem ser tidos em conta (Carneiro-da-Cunha et al., 2011). Os principais componentes de filmes e revestimentos edíveis são as proteínas, que conferem estabilidade; os lípidos, que diminuem a transmissão de água; e os polissacarídeos, influenciando a transmissão de gases (Pavlath & Orts, 2009). As propriedades físico-químicas dos filmes podem ser modificadas ao adicionar certos componentes como plastificantes, agentes de reticulação, entre outros (Han & Aristippos, 2005). Filmes processados sem a adição de plastificantes, tais como o glicerol, demonstraram alta resistência à tensão, porém reduzida capacidade de alongamento (Cian et al., 2015), ocorrendo também uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água (Ganesan et al., 2018).

O material das embalagem, além dos fatores referidos acima, pode conter bioatividades favoráveis como efeitos antioxidantes (Bolumar et al., 2011) e antimicrobianos (Khaneghah et al., 2018), denominando-se embalagens ativas, que resultam no aumento do tempo de prateleira dos alimentos (Han et al., 2018). Diversos tipos de embalagens ativas já são aplicadas comercialmente (Vilela et al., 2018).

A adição de substâncias bioativas, como óleos essenciais, pode conferir atividade a matrizes que em si não as possuem, tornando-as em embalagem ativas. Por exemplo, a adição de óleo essencial de canela a matrizes de alginato/carboximetilcelulose conferindo-lhe propriedades antimicrobianas (Y. Han et al., 2018). Certos polímeros orgânicos possuem potencial semelhante, além de melhorarem as propriedades físicas do material, como a

composição lignina-alginato (Aadil et al., 2016). A adição de certas moléculas, como a vitamina E, pode conferir propriedades antioxidantes e podendo ser aplicada em polímeros como o quitosano (Martins et al. 2012a). Pode ocorrer também e o desenvolvimento de matrizes com potencial fotoprotetor (Ahmed & Ikram, 2016), assim como é possível a adição de pigmentos com propriedades bioativas, como a curcumina associados a hidratos de carbono como o carragenano, permitindo assim aumentar a sua resistência à água e as suas propriedades antioxidantes (Roy & Rhim, 2020), ou potenciar o potencial antimicrobiano recorrendo a licopeno (Asadi & Pirsá, 2020). Em estudos anteriores, filmes de alginato demonstraram capacidade antioxidante sobre tecidos adiposos destinados à área alimentar, esse potencial pode ser melhorado pela adição de extratos de produtos alimentares como o extrato de tomate-cereja, sendo facilmente aplicável na indústria alimentar (Qiu & Chin, 2020).

Apesar dos benefícios inerentes ao embalamento de produtos alimentares, a embalagem pode causar problemas de saúde, devido à ingestão acidental de partículas de elementos não comestíveis, isto ocorre especialmente nas embalagens de plástico (Arvanitoyannis & Bosnea, 2004; Patel et al., 2005). Este problema pode ser minimizado ou completamente anulado com a aplicação de filmes e revestimentos edíveis (Galus & Kadzińska, 2015).

O filme e revestimento edível ideal deve ter certas características, tais como: não conter compostos tóxicos e/ou alergénicos na sua composição, possuir capacidade de aderência uniforme à superfície dos alimentos, regular a migração de água do alimento e trocas gasosas, evitar a absorção ou perda de compostos que interfiram no aroma, sabor ou composição nutricional, fornecer estabilidade bioquímica e microbiana, e ao mesmo tempo proteger contra contaminações e proliferações microbianas. Além disso, deve ser esteticamente atrativo e possuir a capacidade de incorporar aditivos desejáveis (Pavlath & Orts, 2009). Alguns compostos com características próximas a estas já vêm a ser desenvolvidos, como os filmes de amido/quitosano/glicerol, mas as suas proporções influenciam diretamente as suas propriedades, pois maior concentração de quitosano aumenta a resistência a tensão mas diminui a elasticidade e a permeabilidade ao vapor de

água, o inverso acontece com o aumento da concentração do glicerol (Chillo et al., 2008). A metilcelulose é um composto utilizado como espessante e emulsionante na indústria alimentar, e apresenta capacidade de formar filmes, no entanto são facilmente degradados em contacto com água (Debeaufort & Voilley, 1995). Este problema pode ser em parte resolvido pela sua junção com quitosano (Pinotti et al., 2007). As composições têm assim de ser ajustadas a cada composto e às suas interações, de forma a estabelecer um material com as características pretendidas para a sua utilização (Pavlath & Orts, 2009).

Os revestimentos podem ser aplicados de diversas formas, mas as mais comuns são: a aplicação por espalhamento com ferramentas estéreis sobre a superfície, a imersão e a aplicação por *spraying*. Os filmes são normalmente formados por modelagem direta (*casting*) em superfícies niveladas, seguida por secagem, especialmente em estufa. Outro método utilizado mais industrialmente, é a extrusão, apesar de esta metodologia requerer equipamentos específicos, variando grandemente entre compostos (Wang et al., 2018). As esquematizações das metodologias citadas podem ser observadas na Figura 1.3.

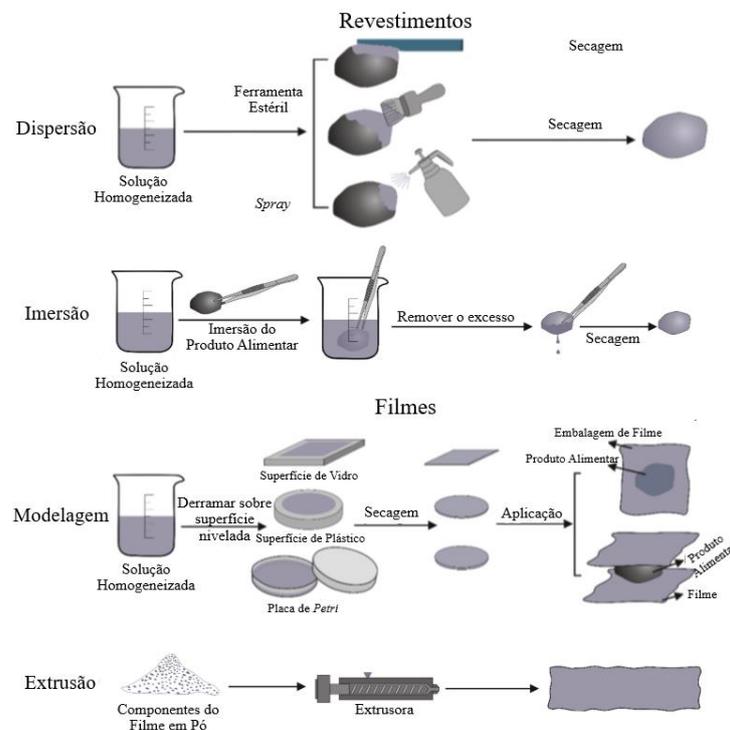


Figura 1. 3 – Esquematização das metodologias de formulação de filmes e revestimentos aplicados à indústria alimentar, adaptados de Wang et al. (2018).

1.3.1. Compósitos

Os materiais compósitos consistem na incorporação de dois ou mais materiais de forma a obter um material final com as características físicas, químicas e/ou bioativas melhoradas (Wang et al., 2017). Os elementos atuam individualmente ou em sinergia, podendo inclusivamente apresentar propriedades ou características que não se encontravam presentes nos elementos isolados (Cian et al., 2014a; Feki et al., 2020; Martins et al., 2012b). A matriz do filme pode apresentar morfologia homogênea ou heterogênea, dependente da compatibilidade dos componentes e da forma de constituição do mesmo (Akhtar et al., 2018; Roy & Rhim, 2020). A constituição de algumas matrizes exige tratamentos com reações químicas e/ou com agentes físicos, como temperatura, ultrassons ou radiação (Wang et al., 2010). Os compostos constituintes dos materiais compósitos podem ser orgânicos, como o carragenano, celulose e pectina ou componentes inorgânicos como a montmorillonita, óxido de grafite e nanopartículas de prata (Abdul Khalil et al., 2019). As bioatividades finais de um filme podem ser intrínsecas do seu principal componente do filme, inerentes aos componentes bioativos incorporado na matriz, ou consequência da estruturação destes materiais. Em alguns casos, um filme pode ser constituído pela fase ativa e o substrato, combinando as propriedades físicas do substrato e as propriedades bioativas da fase ativa (Figura 1.4) (Halonen et al., 2020; Salehi et al., 2017).

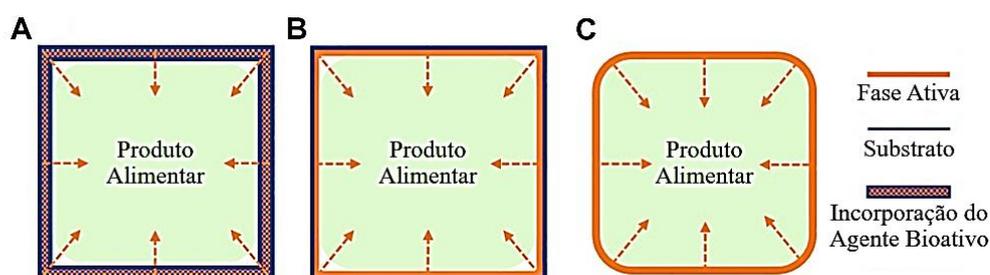


Figura 1. 4 – Filmes com bioatividades por incorporação de agentes bioativos ao polímero (A), aplicação da formulação *layer-by-layer* com substrato e fase ativa (B) e formulação de filmes com polímeros bioativos (C), adaptado de Halonen et al. (2020).

A formação dos filmes com base em materiais compósitos pode ser desenvolvida com diversos componentes, associando polímeros a outros polímeros, a nanopartículas ou a

compostos ativos como óleos essenciais (Abdul Khalil et al., 2017; Feki et al., 2020). A aplicação de polímeros sintéticos não derivados de petróleo, como o álcool polivinílico pode ser uma alternativa, necessitando, no entanto, de sínteses químicas na sua formulação (Meng et al., 2018).

A constituição de materiais com a combinação de polímeros pode ser desenvolvida pela sobreposição de matrizes. É possível expor um componente para o exterior e outro no interior, selecionando a ordem consoante as suas características (Sedayu et al., 2019). Na estruturação do material, de igual modo, pode recorrer-se à sobreposição de várias camadas (J. Zhang et al., 2019), sendo possível a utilização de mais de dois polímeros (Langhe & Ponting, 2016). As matrizes que compõem determinada camada podem ser materiais compósitos homogeneizados (Petrova et al., 2016). O emprego de uma solução filmogénica para agregação de todos os componentes forma uma camada com vários compostos (Jancikova et al., 2019). Porém, mesmo compósitos de uma camada e com uma solução filmogénica podem apresentar matrizes heterogéneas (Ganash et al., 2013). Algumas matrizes são reforçadas pela adição de iões facilitando as suas interações (Paşcalău et al., 2012). A coesão de algumas matrizes compostas por dois ou mais polímeros podem depender do *crosslinking* intermediado por iões ou moléculas (Ahmed & Ikram, 2016).

Matrizes com a adição de nanofibras, como celulose, resultam no aumento da resistência mecânica do filme (Zarina & Ahmad, 2014). No entanto, um reforço com quitosano leva à diminuição da permeabilidade ao vapor de água, à perda de flexibilidade, elasticidade e de transparência dos filmes (Shankar et al., 2015). A incorporação de nanopartículas, como prata, aumentam a resistência ao vapor de água e a atividade antimicrobiana, no entanto levanta-se a possibilidade de contaminação dos alimentos por essas nanopartículas, o que pode ser muito prejudicial, devido à sua toxicidade e possível bioacumulação (Roy et al., 2019).

O desenvolvimento de biopolímeros com óleos essenciais incorporados melhora as propriedades mecânicas dos filmes, tornando-os mais resistentes ao vapor de água, e pode melhorar a sua bioatividade, como a atividade antimicrobiana e antioxidante (Praseptiangga

et al., 2016), porém a sua homogeneização com polissacarídeos solúveis em água depende da aplicação de compostos com propriedades surfactantes que permitam a solubilidade desses óleos em água como o Tween-80 (Benavides et al., 2012). A aplicação de ácidos gordos melhora as características mecânicas de resistência ao vapor de água assim como a diminuição de permeabilidade, no entanto reduz a elasticidade dos filmes, devido a serem moléculas de cadeia longa (Ali et al., 2017; Jiménez et al., 2010). A incorporação de extratos pode ser aplicada de forma a aumentar a bioatividade dos filmes, como a atividade antimicrobiana, porém acrescenta muita complexidade à solução filmogénica, sendo a sua otimização mais difícil (Kanmani & Rhim, 2014).

1.4. Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são um grupo complexo de macromoléculas aniónicas, presentes em diversos organismos, desde mamíferos a algas (Fonseca & Mourão, 2006). A parede celular das algas é uma estrutura heterogénica e complexa, constituída por compostos, que incluem polissacarídeos sulfatados. Estes são distintos para o tipo de alga, sendo das algas verdes o ulvano, composto por unidades de ácidos ulvanobiurónicos do tipo A e do tipo B (Lahaye et al., 1998), das algas castanhas os fucanos, polímeros de α -L-fucose com ligações (1→3) e/ou (1→4) (Rocha, 2016), e das algas vermelhas os carragenanos, que possuem diversas derivações consoante o grau de sulfatação como o *kappa* (κ), o *lameda* (λ) e o *iota* (ι), e os agaranos, da qual faz parte o porfirano (G. Jiao et al., 2011). Dentro das algas vermelhas, os carragenanos são bastante estudados e utilizados, inclusive na indústria alimentar. Já o porfirano que é um polissacárido sulfatado bastante promissor, quando comparado com outros polissacáridos, o estudo e informação disponíveis acerca do mesmo ficam muito aquém (G. Jiao et al., 2011; Rocha, 2016).

Os polissacarídeos sulfatados são extraídos e isolados a partir de algas (Rahman, 2016), utilizando água quente, ácido ou base diluída, recorrendo a grandes volumes de solvente. Porém, podem ser aplicados outros métodos de extração, como a extração assistida por micro-ondas, entre outros.

Em diversos estudos foi relatada uma ampla gama de bioatividades destas macromoléculas, tais como: anticoagulantes (Chandía & Matsuihiro, 2008), anti-trombóticos (Pereira et al., 2002), anti-inflamatórios (Matsui et al., 2003), anti-tumorais (Gardeva et al., 2009), antivirais (Radonic et al., 2010), antialérgicos (Ngo & Kim, 2013) e inclusivamente antioxidantes (Tannin-Spitz et al., 2005; Wang et al., 2008). Muitos destes compostos, provenientes de diferentes grupos de macroalgas, apresentam ainda atividades antifúngicas e antimicrobianas (Vera et al., 2011; Zhu et al., 2016). Devido às suas propriedades físicas, químicas, biomecânicas, às suas características bioativas e à biocompatibilidade que apresentam, os polissacarídeos sulfatados são aplicados em diversas indústrias como a farmacêutica, cosmética, alimentar, equipamentos médicos, entre outras (Caputo et al., 2019; Zaporozhets & Besednova, 2016). O potencial bioativo destas moléculas varia com alguns fatores estruturais como o grau de sulfatação, peso molecular, conformação, e os hidratos de carbono que o constituem e estereoquímica (Costa et al., 2010; Gómez-Ordóñez et al., 2014; Ngo & Kim, 2013; Wijesekara et al., 2011).

As propriedades biomecânicas de um composto, resultam das interações das cadeias que o compõem, especialmente devido às interações dos grupos sulfatados, gerando estruturas tridimensionais, e das interações entre as cadeias poliméricas dos polissacarídeos (Cunha & Grenha, 2016). A presença de cátions, como o Ca^{2+} e o K^+ , podem aumentar a resistências da matriz devido à formação de pontes, com interações *crosslinking* (Mahdavinia et al., 2014; Meng et al., 2018). A presença dos grupos sulfato confere a capacidade de atração de água, permitindo a solubilidade do polímero, mas também a sua retenção, possibilitando a formação de hidrogéis; e a remoção de grupos sulfato pode assim reduzir a solubilidade das matrizes de polissacarídeos sulfatados (Cunha & Grenha, 2016). Os polissacarídeos sulfatados apresentam-se assim como bons candidatos na produção de filmes e revestimentos edíveis (Abdul Khalil et al., 2019).

1.5. *Porphyra*

As algas do género *Porphyra* apresentam uma grande importância comercial, com um elevado volume de produção, devido a serem tradicionalmente muito consumidas no este asiático (Blouin et al., 2011), especialmente devido à utilização de algumas dessas espécies na culinária tradicional japonesa na confeção de *sushi*, conhecida como *nori*, com cada vez mais aceitação na Europa (Knoop et al., 2020). As suas propriedades bioativas, nomeadamente a atividade antimicrobiana (K. Jiao et al., 2019), são reconhecidas há muito tempo, sendo esta espécie utilizada na medicina tradicional Chinesa há mais de um milénio (Q. Zhang et al., 2004).

Foram catalogados 15 géneros, pertencentes à ordem Bangiales, da qual faz parte o género *Porphyra*, constituído por 58 espécies com nomenclatura confirmada. Espécies deste género estão espalhadas por lugares distintos, desde o norte do oceano Atlântico à costa da Austrália, muitas delas com morfologia semelhante e, por esse motivo, por vezes é necessário recorrer as técnicas moleculares para as diferenciar (Sutherland et al., 2011). No entanto, apesar da distribuição das espécies deste género por uma extensa área geográfica e em ambientes diversos, as espécies restringem-se ao seu *habitat*, sendo a *Porphyra suborbiculata*, Kjellman 1897, a única espécie que se encontra em ambos os hemisférios (Broom et al., 2002).

Em termos nutricionais são muito ricas, apresentando um teor de proteínas de 25-40% do peso seco (Nakib et al., 2009) e diversos tipos de ácidos gordos insaturados, apesar dos lípidos corresponderem apenas a aproximadamente 2% do seu peso seco (Blouin et al., 2006). A composição em hidratos de carbono é de cerca de 45% do peso seco (Smith et al., 2010), a composição mineralógica é diversa destacando-se especialmente P, Ca, K e Zn (379,90 mg.100g⁻¹; 443.70 mg.100g⁻¹; 1444,17 mg.100g⁻¹ e 1,46 mg.100g⁻¹ peso seco, respetivamente) (Cian et al., 2014b). Porém, dependendo do meio ambiente, pode apresentar uma gama muito mais alargada e com concentrações divergentes (Rao et al., 2007) e apresenta vitaminas K, C e do complexo B, incluindo a vitamina B₁₂ (Bito et al., 2017). Além de outros compostos, como polifenóis, aos quais são atribuídos uma série de benefícios que

se refletem nos indivíduos com dietas que incluem estas algas, como menor incidência de doenças cardiovasculares, neurovasculares, inflamatórias, entre outros (Venkatraman & Mehta, 2019). No entanto, a sua composição é variável e depende diretamente do ambiente, tanto em termos de parâmetros físicos como químicos, incluindo o efeito da sazonalidade (Tala & Chow, 2014).

A própria atividade antioxidante pode variar ao longo do ano, uma vez que as algas apresentam adaptações, que lhes permitem evitar os efeitos provocados pelos fatores de *stress*, como a incidência de luz solar. quando esta é demasiado intensa (Sampath-Wiley et al., 2008). Este sistema antioxidante de combate ao *stress* provocado por fatores bióticos e abióticos, é comum entre as espécies de algas interditais (Li et al., 2010). Polissacarídeos sulfatados de espécies de *Porphyra*, porfirano, têm apresentado, desde os primeiros ensaios descritos na literatura (Q. Zhang et al., 2003), um elevado potencial antioxidante (Venkatraman & Mehta, 2019).

1.5.1. *Porphyra dioica*

A *Porphyra dioica* J. Brodie & L. M. Irvine 1997 (Figura 1.5) é uma espécie originária da costa do Atlântico norte, que ocorre desde a costa nordeste dos Estados Unidos da América até ao noroeste de Portugal, na zona intertidal (Klein et al., 2003; Pereira et al., 2004).



Figura 1. 5 – *Porphyra dioica* J. Brodie & L. M. Irvine 1997, fontes AlgaeBase (©Ignacio Bárbara e ©Michael Guiry.

O ciclo de vida da *Porphyra dioica* é bifásico e heteromórfico, com gametófito haploide, em frondes separadas, como o próprio nome indica, sendo esta a principal diferença para com a espécie *Porphyra purpurea* uma vez que esta é monoica (Lu & Yarish, 2011), e esporófito diploide filamentosos (Pereira et al., 2006). É uma espécie dioica com um rácio de gametófitos masculinos e femininos de aproximadamente 1:1, que pode reproduzir-se durante todo o ano, apesar de haver maior crescimento em determinados períodos do ano (Holmes & Brodie, 2005), o que resulta numa maior ocorrência entre fevereiro e abril (Pereira et al., 2004). Esta espécie apresenta a fase gametófito não haploide durante a maior parte do ciclo de vida e um sistema de poliploidia complexo, de mais de um nível simultaneamente (Varela-Álvarez et al., 2019). Tem capacidade de produzir conchosporos mesmo sobre condições adversas, facilita a sua reprodução, fazendo com que a produção desta espécie seja um processo mais viável, comparativamente com outras espécies de algas que lhe são semelhantes, incluindo do género *Porphyra* (Pereira et al., 2004). O seu crescimento dá-se na presença de uma gama de condições relativamente alargada, como temperatura (9 °C – 18 °C com temperatura ótima de 15 °C), fotoperíodo (8h:8h e 12h:12h e com menor crescimento 16h:8h, luz:escuro) e intensidade luminosa (80 $\mu\text{mol fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ – 180 $\mu\text{mol fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com maior crescimento a 130 $\mu\text{mol fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Knoop et al., 2020).

Todas as fases do ciclo de vida apresentam um conteúdo de ácidos gordos insaturados, inclusivamente ácidos gordos polinsaturados (PUFA), muito variado e relativamente elevado quando comparado a espécies semelhantes, especialmente a fase conhocelis. Estes estão associados a benefícios gerados pelo seu consumo (Costa et al., 2018). Como descrito anteriormente, para o género de forma genérica, no caso particular da *P. dioica* os compostos, como ficobiliproteínas, compostos nitrogenados e ácidos gordos, podem ter as suas concentrações alteradas por manipulações químicas do meio (Varela-Álvarez et al., 2019).

Devido ao seu rápido crescimento, absorção de nitratos, fosfatos e de dióxido de carbono do meio ambiente, esta espécie apresenta um elevado potencial de biorremediação, permitindo o seu estabelecimento em sistemas de cultura multitrófica (Pereira et al., 2006;

Roleda & Hurd, 2019), com rápida produção de biomassa, que pode ainda pode ser aplicada em rações (Silva et al., 2015).

Estudos demonstram a possibilidade de diversas aplicações, devido aos benefícios dos constituintes desta espécie, como o potencial anti-inflamatório dos seus extratos de ácidos gordos (Robertson et al., 2015), a atividade antioxidante é reconhecida e é maximizada no ambiente gastrointestinal (Pimentel et al., 2020) e a atividade antimicrobiana, especialmente na fração extraída com água:metanol (1:1) (Jindrichova et al., 2019).

1.6. Porfirano

O porfirano (Figura 1.6) é um polissacarídeo sulfatado anidro, extraído de algas do género *Porphyra*, constituído por unidades de dissacarídeos que consistem em resíduos (1,3- β) D-galactose alternando com (1,4- α) L-galactose-6-sulfato ou 3,6-anidro- α -L-galactose, podendo ocorrer a substituições com resíduos de ésteres de sulfato (Fernando et al., 2019). O porfirano encontram-se presente no espaço intercelular, mas principalmente nas paredes celulares, sendo o componente mais abundante das células de algas vermelhas do género *Porphyra* (Q. Zhang et al., 2005). As cadeias de porfirano podem ser degradadas por enzimas denominadas β -porfiranasas (porfirano beta-D-galactopiranosose-(1-4)-alfa-L-galactopiranosose-6-sulfato 4-glicanohidrolase) presentes em bactérias, das quais algumas espécies compõem a flora intestinal humana, como a *Bacteroides plebeius*, o que permite a sua digestão (Y. Zhang et al., 2019). Os grupos sulfato do porfirano representam entre 10 a 11% do peso de biomassa seca (Isaka et al., 2015). Através de modificações estruturais recorrendo a dessulfatação enzimática pode ser convertida em agar, que é um dos polissacarídeo mais comercializados (Rhein-Knudsen et al., 2015).

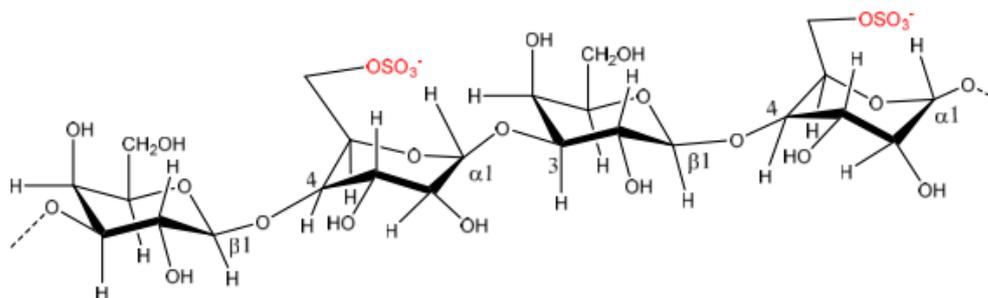


Figura 1. 6 – Estrutura do Porfirano, adaptado de Rhein-Knudsen et al. (2015).

O peso molecular, o grau de sulfatação, a posição dos grupos sulfato, o tipo de açúcar e a ramificação glicosídica, são os parâmetros mais importantes, e que são responsáveis pela bioatividade e características físicas do composto (Raposo et al., 2013).

1.6.1. Bioatividades do Porfirano

No que diz respeito à bioatividade, o porfirano demonstrou propriedades imunossupressoras em ratos, diminuindo a expressão da imunoglobulina E (IgE), no entanto, aumentando a expressão do interferão-*gama* (IFN- γ), o que pode reduzir, por exemplo, a incidência de reações de hipersensibilidade de contato (Ishihara et al., 2005), podendo ser considerado um potencial imunomodulador (Bhatia et al., 2013). A sua interação com determinadas vias enzimáticas e metabólicas, faz com que ocorra um acréscimo na produção de macrófagos (Qing-mei Liu et al., 2017). O potencial anti-inflamatório é diretamente relacionado com o tamanho molecular (Yanagido et al., 2018) e está associado à inibição da produção de óxido nítrico (Z. Liu et al., 2019), a qual pode ser resultado da atividade antioxidante do porfirano, devida à inibição do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), o que reduz os níveis de fatores de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) e óxido nítrico (Nishiguchi et al., 2016).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o consumo de porfirano tem efeito hipolipidêmico e reduz os impactos negativos no fígado, de dietas com elevadas concentrações de lípidos, provavelmente devido à adsorção desses compostos pelo polissacarídeo (Cao et al., 2016).

O seu efeito inibitório sobre o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), resulta na atividade anti-tumoral por apoptose (Kwon & Nam, 2006). Apresentou ainda efeito analgésico e atividade anti-ulcerativa (Bhatia et al., 2015a). Foi descrito como um possível agente terapêutico para a atividade de endotoxinas, ocupando o fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2), necessário para a ligação da toxina ao recetor (Y. Wang et al., 2020).

O porfirano apresenta um elevado potencial antioxidante, demonstrando-se muito eficaz na captação de radicais, como as espécies reativas de oxigénio (Hatada et al., 2006; Isaka et al., 2015). O potencial antioxidante do porfirano é inversamente proporcional ao seu peso molecular e grau de sulfatação (Z. Zhang et al., 2009; Z. Zhang et al., 2010a; Zhao et al., 2006). A sua atividade antioxidante produziu efeitos *in vivo*, promovendo um efeito antienvhecimento em organismos que o consumiam regularmente, em que mais uma vez, os compostos com menor peso molecular se demonstraram mais eficazes (Zhao et al., 2008). Este efeito reflete-se no decréscimo de células senescentes mesmo após tratamento com H₂O₂ (Z. Zhang et al., 2018).

A atividade antifúngica, sobre *Candida albicans* e *Aspergillus* sp., também está diretamente associada ao peso molecular assim como ao grau de sulfatação, sendo o menor e o maior, respetivamente, os mais eficazes (Bhatia et al., 2014; Bhatia et al., 2015b).

1.7. Métodos de Extração de Polissacarídeos

Métodos de extração com água quente como solvente, seguida de filtrações e precipitação com etanol 95%, apresentam rendimento elevado, 17,6%, porém a sua contaminação por proteínas também se apresenta elevada, 1,1-0,4%, (D. He et al., 2019). O extrato pode ser filtrado recorrendo a filtros de partículas finas como Celite®, permitindo uma remoção da maioria dos resíduos não dissolvidos (Z. Zhang et al., 2010b), porém a

aplicação destas metodologias pode exigir um longo período de tempo e consumo de energia devido às elevadas temperaturas que requerem (Xu et al., 2017). A utilização de solventes orgânicos, extração com etanol 85%, é mais dispendiosa e apresenta um rendimento inferior ao da água quente, com rendimento de 10,6% (Isaka et al., 2015), além de solventes orgânicos poderem ser prejudiciais na questão ambiental, após o seu descarte (Pinto e Costa, 2016). No entanto, se a massa recuperada não for sujeita a lavagens com solventes orgânicos pode resultar na obtenção de um material muito escuro (Bhatia et al., 2015b).

A extração com o equipamento de extração *Soxhlet* permite a extração por água quente e posterior purificação, sendo semelhante ao método de extração por filtração. Neste caso, também se obtém rendimentos elevados, porém a contaminação por proteína é muito inferior, próximo de 0%, devido ao contacto indireto estabelecido neste sistema (Bhatia et al., 2015a; Zhu et al., 2016). O sistema pode ser adaptado, alterando o solvente como o etanol, para a extração de lípidos (Taboada et al., 2013) ou adicionando agentes químicos, como no caso de tratamentos como a despigmentação (Bedoux et al., 2017).

A utilização de micro-ondas pode ser outra alternativa na extração do porfirano, com a possibilidade de serem realizadas em larga escala, no entanto o seu rendimento é de apenas 5% (Y. Chen & Xue, 2019). Já a utilização de ultrassons e micro-ondas aplicados à extração com *Soxhlet*, podem levar a um aumento do rendimento de extração de polissacarídeos, apesar dessa diferença ser baixa e o equipamento necessário exigir elevado consumo e manutenção frequente (Dong et al., 2011). A extração recorrendo a fluido supercrítico de CO₂ e ultrassons, demonstra vantagens, produzindo um extrato de elevada pureza, o que pode resultar num aumento da bioatividade, mas é necessário, para a sua aplicação, equipamento muito específico e dispendioso, além do seu rendimento ser consideravelmente baixo, 6,24% peso seco (Yu et al., 2015; Zhou et al., 2012).

A utilização de enzimas, como as proteases, pode aumentar o rendimento da extração de polissacarídeos, facilita a remoção entre matrizes e a eliminação de contaminantes (Lim et al., 2014). As hidrolases facilitam o seu arrastamento (Fleita et al., 2015), entre outras.

Contudo, a utilização de enzimas é dispendioso, demorado e limita as condições do meio reacional às condições ótimas das enzimas (Nadar et al., 2018).

A utilização de solventes como metanol e clorofórmio podem ser utilizados no isolamento do composto, eliminando elementos com peso molecular baixo (Lim et al., 2014), mas a elevada toxicidade destes solventes torna o seu uso, no desenvolvimento de produtos destinados à área alimentar, como neste caso, desaconselhável, devido à eventual presença de resíduos tóxicos (Al-Taher & Nemzer, 2018).

1.8. Objetivo

1.8.1. Geral

Com o desenvolvimento deste projeto pretende-se desenvolver um método de extração de porfirano semi-refinado de *Porphyra dioica* para a formulação de filmes com propriedades bioativas para a aplicação em embalagens de produtos alimentares que permitam o prolongamento do tempo de prateleira, evitando o desperdício de forma sustentável.

1.8.2. Específicos

- Extração de porfirano semi-refinado a partir de *Porphyra dioica*.
- Avaliação bioquímica e das bioatividades (antioxidante e antimicrobiano) dos extratos.
- Desenvolvimento de soluções filmogénicas e otimização do desenvolvimento dos filmes.
- Avaliação das bioatividades (antioxidante e antimicrobiano) e das propriedades mecânicas dos filmes.
- Aplicação dos filmes em embalagens e análise sensorial dos produtos embalados.

2. Métodos

2.1. Otimização da Extração de Porfirano de *Porphyra dioica*

As extrações foram realizadas recorrendo a um extrator *Soxhlet* individual e uma manta de aquecimento Fibroman-c (J.P Selecta s.a., Abrera, Barcelona, Espanha), seguido de um processo de evaporação em evaporador rotativo, precipitação com isopropanol e secagem em estufa (Figura 2.1).

Cerca de 15 g de *Porphyra dioica* seca em pó ($\leq 0,25$ mm) (ALGAplus, Ílhavo, Aveiro, Portugal) foram distribuídas sobre três folhas de papel absorvente (663,75 cm² por folha), seguidamente dobradas ao meio e enroladas sobre si, formando um cartucho. Os três cartuchos foram humedecidos com água destilada e colocados no extrator *Soxhlet* de 125 mL. Num coletor de 500 mL foram colocados 250 mL de água destilada e pedaços de cerâmica, o líquido de refrigeração do condensador foi a água destilada. A manta Fibroman-C (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona, Espanha) foi mantida a cerca de 200 °C em intervalos de tempo de 7 horas, após esse período a manta foi desligada e repousou durante a noites, o conteúdo do coletor foi então recuperado, este processo repetiu-se por cinco dias. O material extraído nas duas primeiras horas de extração foi descartado em PorfP1, seguido de 5 intervalos de 7 horas, e o material da primeira hora em PorfP2, seguido de 2 intervalos de 7 horas.

Após recuperar o conteúdo do coletor, o extrato obtido foi aquecido e filtrado em vácuo, utilizando filtro de papel quantitativo 2240 de 90 mm (Filter-Lab, Laval, Quebec, Canadá), tendo posteriormente o filtrado sido evaporado num evaporador rotativo, refrigeração RC-10 Digital Chiller (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) e bomba de vácuo V-100 (Rotoquímica, Maia, Porto, Portugal), a 60 °C em banho HB 10 (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA), 260 rpm e 72 mbar com controlador RV10 control (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA), até se obter uma massa espessa e muito viscosa. Adicionaram-se 300 mL de isopropanol $\approx 90\%$ e 100 ml de isopropanol $\approx 99,9\%$ (Carlo Erba, Milão, Lombardia,

Itália) e deixou-se precipitar por 30 minutos. O resíduo foi decantado e adicionou-se 200 mL de isopropanol $\approx 99,9\%$. O conteúdo foi fragmentado num liquidificador e filtrado a vácuo com filtro de papel quantitativo 2240 de 90 mm, adicionando-se pequenos volumes de isopropanol $\approx 99,9\%$ até a massa se apresentar seca. Esta foi recuperada para tubos de centrifugação, os quais foram colocados em estufa UF 450 (Memmert, Büchenbach, Roth, Alemanha) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para remover todos os eventuais resíduos de solventes, até peso constante.

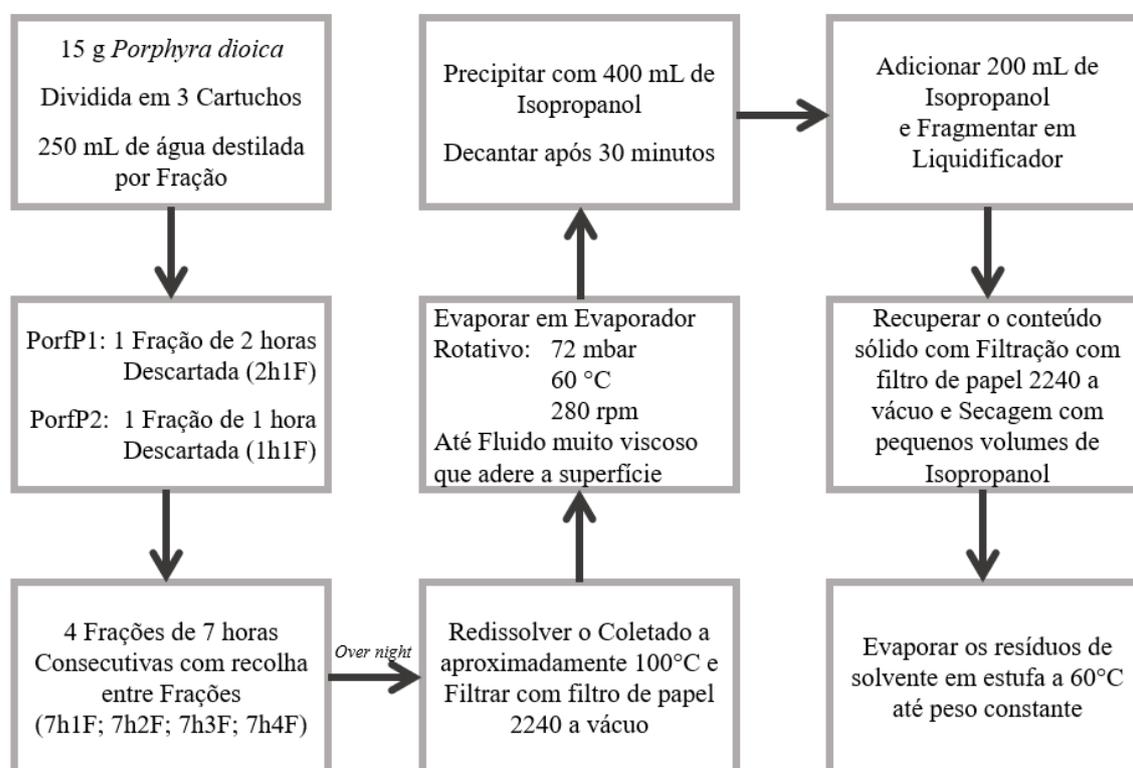


Figura 2. 1 – Fluxograma do procedimento de extração de porfirano semi-refinado a partir de *Porphyra dioica* desenvolvido.

2.2. Métodos de Quantificação Colorimétricos

As metodologias utilizadas recorreram, quando aplicável, à utilização de uma balança analítica TE 1245 (Sartorius, Göttingen, Alemanha), a homogeneização foi feita no

equipamento de ultrassons USC-TH (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) e as medições de pH num potenciómetro pH 7110 (WTW inoLab, Canton, Massachusetts, EUA). Todas as medições, quando aplicável, foram realizadas num espectrofotómetro Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com o *software* INSIGHT 2 (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, EUA) recorrendo a cuvetes de quartzo de 3 mL. Todas as soluções de porfirano foram preparadas em banho a 75 °C.

Todas as análises foram realizadas em ensaios independentes e em triplicados no caso do *p*-BQ, TPC, DPPH, FRAP e ABTS; e em quadruplicado no ensaio de HPSA e Fenol Sulfúrico. Os ensaios colorimétricos foram calibrados segundo a lei de *Lambert-Beer*, tendo todos os ensaios a garantia de linearidade de reação.

2.2.1. *p*-Benzoquinona (*p*-BQ)

A *p*-benzoquinona ou 1,4-benzoquinona é uma molécula da família das quinonas com um papel importante nas regulações de sistemas biológicos e na formação de cadeias de transferência de eletrões (Lamé et al., 2003).

O reagente *p*-benzoquinona liga-se a aminos primárias e a grupos amina, apresentando uma coloração específica, sendo possível desta forma estabelecer uma relação entre a presença de aminos primárias e grupos amina com a concentração de proteínas (Abdellatef & Khalil, 2003). Este método permite uma determinação do conteúdo total de proteína mais preciso que métodos amplamente aplicados como o ensaio de Lowry (Zala et al., 1992) pois permite a determinação de todos os tipos de aminoácidos (Amin & El-Didamony, 2003), além de apresentar uma metodologia mais simples, menos sujeita a erros, e com reagentes menos dispendiosos (Barreto et al., 1990). Porém, a sensibilidade deste método é diretamente influenciada pelo pH do meio, pelo que o comprimento de onda com absorvância máxima dependerá da utilização de tampão e do seu pH (El-Sayed et al., 1986).

Este ensaio foi adaptado de Amin & El-Didamony (2003), tendo a reação sido mediada pelo tampão fosfato 0,08 M a pH 9,2, composto por fosfato de sódio monobásico anidro (Amresco, Solon, Ohio, EUA) e hidróxido de sódio (Eka, Akzo Nobel, Marietta, Geórgia, EUA). A solução de *p*-Benzoquinona (*p*-BQ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) com uma concentração inicial de 1 mg.mL⁻¹ foi preparada para cada análise, em tampão fosfato a pH 9,2. O padrão externo foi obtido através de diluições de uma solução de L-alanina (PanReac AppliChem, Castellar del Vallès, Barcelona, Espanha) a 0,3 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato a pH 9,2. As amostras foram preparadas em tampão fosfato a pH 9,2, com uma concentração de 0,6 mg.mL⁻¹. A solução de HCl (VWR Chemical, Radnor, Pensilvânia, EUA) 2,5 M foi preparada em etanol 96% (Aga, Loures, Portugal). As concentrações da calibração de L-alanina foram 30 µg.mL⁻¹; 25 µg.mL⁻¹; 20 µg.mL⁻¹; 15 µg.mL⁻¹; 10 µg.mL⁻¹; 5 µg.mL⁻¹ e 0 µg.mL⁻¹ correspondente a um volume no meio reacional de 2 mL diluídas com tampão fosfato a pH 9,2, ao que se adicionou 1 mL de *p*-BQ, imediatamente após a sua adição foram mantidos em banho a 50 °C por 15 min. No final do período estabelecido, adicionou-se 3 mL de HCl 2,5 M e realizou-se a leitura do espectro de absorvância entre 400 e 700 nm. As amostras seguiram os mesmos procedimentos, tendo de concentração final 60 µg.mL⁻¹.

Com as leituras realizadas foi construída uma curva de calibração com as concentrações padrão de L-alanina, tendo ao espectro de todos os pontos sido descontado a espectro do branco. Os resultados das amostras foram interpretados com base nessa curva de calibração.

2.2.2. Fenol Sulfúrico

O método do fenol sulfúrico é um teste colorimétricos que permite uma análise quantitativa de hidratos de carbono solúveis em água (DuBois et al., 1956; Hall, 2013). A sensibilidade e simplicidade tornam-no um método muito utilizado, além de detetar hidratos de carbono conjugados com outros compostos como os glicolípido e glicoproteínas (Masuko et al., 2005). A determinação pode ser realizada por calibração externa, elaborando uma

curva de calibração, para cada classe de hidrato de carbono, como a galactose, estabelecendo a relação absorvância/concentração de glucose (Zhang & Lynd, 2005).

A sua reação é bem conhecida e fiável relativamente à produção de resultados mensuráveis. A reação em si envolve a adição de fenol e ácido sulfúrico a uma solução aquosa da amostra, contendo os hidratos de carbono, o que leva à produção de derivados de furfural, devido à desidratação dos hidratos de carbono pelo ácido sulfúrico e à consequente condensação destes com o fenol. Os produtos de condensação formados são coloridos e podem ser analisados via espectrofotometria de UV-Visível (Albalasmeh et al., 2013).

O método tem capacidade de detetar todas as classes de hidratos de carbono, no entanto, a reatividade destes depende da estrutura. Como tal, os resultados devem ser expressos em termos de um hidrato de carbono que seja o constituinte principal da amostra, sendo a D-galactose no caso do porfirano. A desidratação da D-galactose gera 5-(hidroximetil) furfural, que por sua vez irá condensar com o fenol e formar um composto colorido com um máximo de absorção a 495 nm (Nielsen, 2003; Zhang & Lynd, 2005), permitindo assim a quantificação dos hidratos de carbono presentes numa solução (Rao & Pattabiraman, 1989).

A solução de fenol a 10 mg.mL^{-1} de concentração inicial foi preparada, para cada análise, em água destilada com cristais de fenol (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O padrão externo foi obtido através da diluição de uma solução de D-galactose (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) a $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ água destilada. As amostras foram preparadas em água destilada numa concentração de $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$. As concentrações da calibração de D-galactose foram $45 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $37,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $22,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $11,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $7,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondente a um volume no meio reacional de $0,6 \text{ mL}$, diluídos com água destilada, ao que se adicionou $1,8 \text{ mL}$ de ácido Sulfúrico 95% (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) e $0,6 \text{ mL}$ de solução de fenol, após o final da reação exotérmica foram adicionados 5 mL de água destilada e realizou-se a leitura do espectro de absorvância entre 400 e 700 nm , baseado em Rao & Pattabiraman (1989). As amostras seguiram os mesmos procedimentos, tendo a de concentração final de $45 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Realizou-se ainda a

medição do espectro das amostras com H₂SO₄ e água destilada nas proporções descritas substituindo a solução de fenol por água destilada, este espectro foi descontado aos ensaios correspondentes. Ao espectro de todas as amostras e pontos de calibração foi descontado o espectro do branco.

2.2.3. Quantificação total de fenóis (TPC)

O procedimento, recorrendo ao reagente Folin-Ciocalteu (F-C), permite a determinação de fenóis, outros agentes antioxidantes ou oxidantes (Singleton et al., 1999). Apesar de ser amplamente utilizado na deteção de fenóis, devido à sua não especialização para os mesmos, pode levar a subestimações neste parâmetro por interferência de outras espécies antioxidantes e oxidantes (Ainsworth & Gillespie, 2007).

O mecanismo em que se baseia este método é a redução de (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻, sendo esta a espécie reativa presente no F-C, de coloração amarela em meio ácido. Esta espécie apresenta uma coloração azul à medida que é reduzida em meio alcalino, na presença de Na₂CO₃. O meio deve ser alcalino durante o ensaio de forma a minimizar a interferência de outras espécies redutoras (Ainsworth & Gillespie, 2007; Rover & Brown, 2013).

Os dados devem ser interpretados através da comparação da sua absorvância com uma calibração com ácido gálico a 760 nm, sendo os dados obtidos representados em equivalentes de ácido gálico (Fu et al., 2010).

A quantificação do total de fenóis foi determinada com o reagente *Folin-Ciocalteu* (F-C) (AppliChem, Darmstadt, Darmstadt, Alemanha) com base no método de Fu *et al.* (2010). Foram preparadas soluções de extrato a 2 mg.mL⁻¹ em água, o reagente F-C foi diluído 1:10 em água, e a solução de carbonato de sódio (Scharlau, Sentmenat, Barcelona, Espanha) saturada a 75 mg.mL⁻¹. A análise foi realizada pela adição de 0,5 mL da amostra e 2,5 mL de reagente F-C diluído, esta foi reservada por 4 minutos, após esse período

adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio, após um período de 2 horas à temperatura ambiente foi lida a absorvância a 760 nm. A calibração foi obtida recorrendo a uma solução de ácido gálico (Merck KGaA, Darmstadt, Darmstadt, Alemanha) a 0,1 mg.mL⁻¹, com as seguintes concentrações 6 µg.mL⁻¹; 5 µg.mL⁻¹; 4 µg.mL⁻¹; 3 µg.mL⁻¹; 2 µg.mL⁻¹; 1 µg.mL⁻¹; 0 µg.mL⁻¹, estabelecendo um volume total de 0,5 mL em água, tendo ao espectro de todos os pontos sido descontado o espectro do branco.

2.2.4. *Hydrogen peroxide scavenging assay* (HPSA)

O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) é uma espécie oxidante não-radical (Chandrasekara & Shahidi, 2011), desta forma tem a capacidade de induzir a oxidação de outras moléculas (Berczyński et al., 2017), sendo altamente reativo com metais de transição como o Fe²⁺ (Akinrinde et al., 2018). Participa na regulação da apoptose e autofagia celular (J. He et al., 2018).

A oxidação promovida pelo H₂O₂ pode ser inibida por alguns compostos, este é considerado um efeito antioxidante (Kim et al., 2015). Na presença de um antioxidante o H₂O₂ é convertido em oxigénio e água, diminuindo assim a sua concentração (Akinrinde et al., 2018).

O *Hydrogen peroxide scavenging assay* (HPSA) usado neste trabalho envolve a decomposição oxidativa de um corante orgânico, como o vermelho de metilo, por ação do H₂O₂, sendo esta reação catalisada por um complexo de Ferro(III), o etilenodiaminotetraacetato de ferro e sódio (NaFeEDTA), na presença de ácido acético. É um teste colorimétrico, onde é possível observar o se o analito é capaz de manifestar atividade antioxidante, face a espécies reativas de oxigénio e suprimir a decomposição do corante. A decomposição do corante resulta na diminuição da absorvância a determinado comprimento de onda, 524 nm, previamente tomada com referência (Bektaşoğlu et al., 2008; S. Chen & Schopfer, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1992).

A solução reacional foi preparada medindo-se 12 mg de vermelho de metilo, num balão de 500 mL (Ika, Radnor, Pensilvânia, EUA), com 0,2 mL de ácido acético (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA), perfazendo-se com água destilada. Após homogeneizar o máximo possível, formando uma solução saturada, filtrou-se com filtro de papel 2240 para um frasco âmbar, num balão de 250 mL adicionou-se 0,251 g de NaFeEDTA, formado pela junção de ácido etilenodiamina tetra-acético sal dissódico dihidratado (VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia, EUA) e cloreto de Ferro(III) (Labkem, Barcelona, Espanha), perpez-se com a solução de vermelho de metilo filtrado.

O procedimento foi adaptado a partir de Bektaşoğlu *et al.* (2008). Colocou-se 1 mL de amostra, a $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, e 1,8 mL de uma solução de ácido etilenodiamina tetra-acético de sódio férrico (NaFeEDTA) e vermelho de metilo numa cuvete de quartzo, adicionou-se 200 μL de peróxido de hidrogénio a 30% (Chem-Lab, Zedelgem, Flandes Oriental, Bélgica), homogeneizou-se, prosseguiu-se imediatamente à leitura de absorvância a 524 nm e após 10 e 15 minutos. Foram realizadas duas retas de calibração com etanol 96% (álcool primário) e isopropanol 99,9% (álcool secundário), a partir da diluição 1:100 (álcool:água), com pontos a 4, 3, 2, 1 e 0 μL o restante 1 mL completado com água destilada. A captação das moléculas de H_2O_2 é observada pela comparação da variação da absorvância do início e após o tempo estipulado, determinou-se a variação de absorvância (ΔAbs) após 10 (t_{10}) e 15 (t_{15}) minutos, através da seguinte equação:

$$\Delta\text{Abs a } 524 \text{ nm} = \text{Abs } 524 \text{ nm}_{t_0} - \text{Abs } 524 \text{ nm}_{t_x} \quad (1)$$

2.2.5. Ensaio do reagente 2,2-difenil-1- picrilhidrazila (DPPH)

Este método tem como princípio a redução de um radical livre estável, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), por um composto, estimando-se assim o potencial antioxidante desse composto (Brand-Williams *et al.*, 1995), esta reação pode ser caracterizada da seguinte forma:



O radical livre de DPPH, que representa os radicais livres formados no sistema biológico, têm a sua atividade suprimida pela substância AH, antioxidante. O A• é submetido a outras reações que controlam a estequiometria global, ou seja, o número de moléculas de DPPH reduzidas por cada molécula do redutor é diretamente proporcional. Desta forma, este método baseia-se em fornecer a ligação aos radicais presentes nas reações que ocorrem num sistema oxidante (Molyneux, 2004). O DPPH é solúvel em solventes orgânicos como o etanol e o acetonitrilo (Ordoudi et al., 2006).

Este é um método espectrofotométrico, monitoriza a diminuição de absorvância a 515-520 nm estabelecida pelo DPPH• (violeta), o que confere ao meio reativo uma cor amarela pálida característica do grupo picrílico (Noipa et al., 2011). Esta variação pode ser quantificada tendo em conta compostos reconhecidamente antioxidantes, como o ácido ascórbico (Floegel et al., 2011), através da absorvância após o tempo estipulado, 30 minutos, do meio reacional contendo um agente antioxidante e de um meio sem esse agente, estabelece-se a sua taxa de inibição da oxidação (Ebrahimabadi et al., 2016), através da seguinte equação:

$$\text{Taxa de Inibição/mgExt (\%)} = \frac{\text{Abs}_{517\text{Branco}} - \text{Abs}_{517\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{517\text{Branco}}} \times 100 / \text{mExtrato (mg)} \quad (3)$$

2.2.5.1. Em Acetonitrilo

Foram preparadas soluções de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a 0,1 mg.mL⁻¹ para cada análise em acetonitrilo (Chem-Lab, Zedelgem, Flandres Ocidental, Bélgica), este método foi baseado em Miceli *et al.* (2018) com alterações. Na preparação do padrão recorreu-se a uma solução de ácido ascórbico (Vilassar de Dalt, Barcelona, Espanha) a 0,2 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato pH 5,5. As amostras foram preparadas em tampão fosfato 0,08 M a pH 5,5 a concentração de 0,6 mg.mL⁻¹.

As concentrações da calibração de ácido ascórbico foram 6 µg.mL⁻¹; 5 µg.mL⁻¹; 4 µg.mL⁻¹; 3 µg.mL⁻¹; 2 µg.mL⁻¹; 1 µg.mL⁻¹ e 0 µg.mL⁻¹ correspondente a um volume no meio

reacional de 2 mL aferidos com TF a pH 5,5, ao que se adicionou 1 mL de DPPH e 0,5 mL de acetonitrilo. A reação deu-se no escuro à temperatura ambiente. Após 30 minutos, mediu-se a absorvância entre 400 e 700 nm. A curva de calibração foi elaborada com base na absorvância a 517 nm. O meio reacional das amostras foi constituído por 1 mL de amostra, 0,5 mL de TF a 5,5 mL, 1 mL de DPPH e 0,5 mL de acetonitrilo.

2.2.5.2. *Em Metanol*

A solução de DPPH foi preparada a $0,142 \text{ mg.mL}^{-1}$ em metanol (Chem-Lab, Zedelgem, Flandres Ocidental, Bélgica) e o padrão estabelecido com uma solução de ácido ascórbico a $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ em água destilada, baseado em Andrade *et al.* (2018). As amostras foram preparadas em água à concentração de $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$.

As concentrações da calibração de ácido ascórbico foram $2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,6 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,8 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,4 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ correspondente a um volume no meio reacional de 0,05 mL aferidos com água, ao que se adicionou 2 mL de DPPH a partir de uma solução a $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$. A reação deu-se no escuro à temperatura ambiente. Após 30 minutos, mediu-se a absorvância entre 400 e 700 nm. A curva de calibração foi elaborada com base na absorvância a 517 nm. O meio reacional das amostras foi constituído por 0,05 mL de amostra e 2 mL de DPPH.

2.2.6. *Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)*

O método de *Ferric-reducing antioxidant power* (FRAP) tem como fundamento a capacidade redutora de um análogo de ferro (Kim et al., 2019). O poder redutor do composto é então associado ao seu potencial antioxidante (Jones et al., 2017), desta forma, e apesar de ser amplamente aplicado, este método não deve ser utilizado isoladamente pois a não deteção da capacidade redutora não significa necessariamente que a amostra não possua poder antioxidante (Antolovich et al., 2002).

O poder redutor é determinado pela conversão de um complexo de Fe(III) associado ao ligante cromogéneo em um Fe(II), associado ao mesmo ligante, o que resulta na alteração da absorvância (Abs) a determinado comprimentos de onda, 510 nm, permitindo a sua análise (Berker et al., 2007).

O potencial antioxidante pode ser avaliado de duas formas, sendo o FRAP *value* expresso em $\mu\text{mol Fe(II)/mL}$ (Qing Liu et al., 2019) e a comparação com um padrão como ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT), ou outro, indicando o potencial antioxidante do composto em equivalentes do padrão (Akinrinde et al., 2018).

Na preparação do padrão recorreu-se a uma solução de ácido ascórbico (Vilassar de Dalt, Barcelona, Espanha) a $0,292 \text{ mg.mL}^{-1}$ em água destilada. As amostras foram preparadas em água destilada a concentração de $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$.

As concentrações da calibração foram $2,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,65 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ correspondente a um volume no meio reacional de 2 mL perfeitos com água destilada, ao que se adicionou 1 mL de reagente $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]\text{Cl}_3$. O complexo $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]\text{Cl}_3$ a 3,3 mM foi preparado a partir de 1,10-fenantrolina monoidratada ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de HCl em água destilada segundo Adão et al. (2021). A reação deu-se no escuro à temperatura ambiente. Após 30 minutos adicionou-se 6 mL e mediu-se a absorvância entre 400 e 700 nm. A curva de calibração foi elaborada com base na absorvância a 510 nm, adaptado de Berker *et al.* (2007). O meio reacional das amostras foi constituído por 1 mL de amostra, 1,5 mL de água destilada e 1 mL de reagente $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]\text{Cl}_3$, a reação, após os 30 minutos foram adicionados 6 mL.

2.2.7. Ensaio do reagente 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)

O ensaio com o catião radical 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) ($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$) (ABTS) é utilizado na determinação da atividade antioxidante de soluções aquosas (Re et al., 1999). Assim como o DPPH baseia-se na transferência de elétrons e redução de uma espécie colorida, porém este método apresenta maior velocidade de reação e, em muitos casos, uma maior capacidade de detecção da atividade redutora dos agentes antioxidantes (Floegel et al., 2011). Este consiste na redução do radical $ABTS^{+\bullet}$ previamente oxidado com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), resultando assim na diminuição da coloração azul que o caracteriza a 734 nm (Nenadis et al., 2004). A interpretação é semelhante à taxa de inibição do DPPH, porém com os dados da absorvância a 734 nm (Dudonné et al., 2009).

O reagente ABTS foi preparado a partir de 48 mg de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ($C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2$) (Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, EUA) e 12,8 mg peroxidissulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, EUA) em 250 mL de água. Antes da sua aplicação, esteve armazenado por 16 horas no escuro, à temperatura ambiente. A calibração foi executada a partir de uma solução de ácido ascórbico a $61,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com concentrações de $6,12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $5,10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $4,08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $3,06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $2,04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $1,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No caso da amostra foi preparada a $0,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O meio reacional foi constituído por 2 mL de reagente ABTS, 2 mL de amostra ou ácido ascórbico e 2 mL de água destilada, a reação deu-se em 1 minuto e a sua absorvância de 500 a 850 nm foi determinada imediatamente após esse período, o procedimento foi modificado a partir de Re et al. (1999). A análise do ensaio foi realizada com base na absorvância a 734 nm, recorrendo à seguinte equação:

$$\text{Taxa de Inibição/mgExt (\%)} = \frac{\text{Abs}_{510\text{Branco}} - \text{Abs}_{510\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{510\text{Branco}}} \times 100/\text{mExtrato (mg)} \quad (4)$$

2.3. Antibiogramas

Os antibiogramas são um ensaio de sensibilidade de uma determinada espécie microbiana a um determinado composto (Awoyinka et al., 2007), baseia-se na difusão de um composto em teste, a partir de um ponto de origem, os discos, em meio de cultura sólido inoculado com o microrganismo em teste, considerando que o composto se apresenta menos concentrando no meio de cultura à medida que aumenta a distância ao ponto de origem. A distância até a qual o organismo se propaga do ponto de origem do composto permite determinar a sensibilidade de um organismo específico para um composto (Ebrahimabadi et al., 2016; Fleita et al., 2015).

As propriedades antimicrobianas dos extratos, dos componentes e das soluções filmogénicas foram determinadas por antibiogramas com o método de difusão em disco adaptado de Awoyinka *et al.* (2007). Procedeu-se à dissolução do extrato numa concentração de 10 mg.mL⁻¹ em água Milli-Q®, tendo a dissolução sido feita em banho-maria a 80 °C. As estirpes utilizadas foram as bactérias Gram-Positivas *Bacillus subtilis* (DSM 10), *Bacillus cereus* (DSM 31), *Micrococcus luteus* (DSM 1605) e as Gram-Negativas *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 288), *Escherichia coli* (DSM 301) e o fungo *Candida albicans* (DSM 1386). As estirpes foram inoculadas no meio de crescimento adequado (informação fornecida pelo fornecedor) e cultivadas por 24-48h. O inóculo foi diluído com soro 0,85% (m/v) cloreto de sódio (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) e ajustado ao padrão 0,5 McFarland. Foram utilizadas placas com meio *Muller Hinton Agar* (MHA) (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) e *Universal Medium for Yeasts* (UMY), para bactérias e leveduras respetivamente. As estirpes microbianas foram inoculadas, com o inóculo padronizado, por esfregaço com zaragatoa estéril, cobrindo totalmente a superfície da placa. Em seguida, discos de papel de filtro estéreis, com 6 mm de diâmetro, foram embebidos em 20 µL de cada extrato (10 mg.mL⁻¹) e colocado na superfície do ágar, assim como discos contendo cloranfenicol (30 µg / disco) e fluconazol (25 µg / disco), como controle positivo para bactérias e fungos respetivamente, e discos com 20 µL de água estéril, como controle negativo. As placas foram incubadas 24-48 horas na temperatura ideal de cada estirpe (informação fornecida pelo fornecedor) e a zona de inibição foi medida (mm). Todos os testes foram realizados em triplicado.

2.4. Formação dos Filmes

Os filmes foram produzidos por um processo de modelagem, recorrendo a placas de Petri como molde, a metodologia foi adaptada de Nieto (2009). As medições de massa foram feitas numa balança analítica TE 1245 (Sartorius, Göttingen, Alemanha) e a homogeneização das soluções foi feita em placa de aquecimento com agitação magnética VHP-C10-2 (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA). As soluções filmogénicas foram preparadas a partir do porfirano semi-refinado PorfP2, descrito acima, de carboximetilcelulose de sódio (CMC) (Fluka, Buchs, São Galo, Suíça), pectina (PcT) (Sosa, Moià, Barcelona, Espanha), alginato de sódio (AL) (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA), glicerol 86-88% (Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Espanha) e cloreto de cálcio (CaCl_2) (Chem-Lab, Zedelgem, Flandes Oriental, Bélgica) em proporção descrita na Tabela 2.1, dissolvidos em água destilada a 100 °C e com agitação constante. Após a solubilização total do polissacárido, as soluções foram filtradas com papel de filtro a vácuo, e, quanto aplicável, o glicerol foi adicionado. De forma a homogeneizar totalmente a solução filmogénica filtrada, esta permaneceu durante 1-2h a aproximadamente 100 °C com agitação constante, antes de ser aplicada nos moldes. A solução filmogénica foi transferida com o volume proporcional à área do molde, como placas de Petri, a 0,44 mL.cm⁻², tendo sido utilizados moldes de 22,90 cm² (10 mL), 56,75 cm² (25 mL) e 153,94 cm² (68 mL). Os moldes com a solução permaneceram sobre vácuo por 20-60 min de forma a garantir o nivelamento e reduzir ao máximo o estabelecimento de bolhas. Os moldes foram colocados na estufa UF 110 (Memmert, Büchenbach, Roth, Alemanha) a 40 °C, 10% da capacidade de ventilação e abertura a 70% por 18-20h. O molde foi colocado sobre uma superfície a aproximadamente 60 °C e o filme foi removido do molde.

Tabela 2. 1 – Composição das soluções filmogénicas pelos componentes porfirano semi-refinado extraído pelo método 2 (PorfP2), carboximetilcelulose de sódio (CMC), pectina (PcT), alginato de sódio (AL) e glicerol (Gli).

	Porf P2 (% m/v)	CMC (% m/v)	PcT (% m/v)	AL (% m/v)	Gli (μ L/mL)
PorfP2	1	0	0	0	0
PorfP2_Gli	1	0	0	0	1,2
PorfP2_CMC	1	1	0	0	0
PorfP2_CMC_Gli	1	1	0	0	1,2
PorfP2_PcT	1	0	1	0	0
PorfP2_PcT_Gli	1	0	1	0	1,2
PorfP2_AL	0,5	0	0	1	0
PorfP2_AL_Gli	0,5	0	0	1	1,2

Nos moldes de 22,90 cm² a solução filmogénica do filme PorfP2 foi constituída por 100 mg de extrato de PorfP2, PorfP2_Gli por 100 mg de extrato de PorfP2 e 12 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_PcT por 100 mg de extrato de PorfP2 e 100 mg de PcT, PorfP2_PcT_Gli por 100 mg de extrato de PorfP2, 100 mg de PcT e 12 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_CMC por 100 mg de extrato de PorfP2 e 100 mg de CMC, PorfP2_PcT_Gli por 100 mg de extrato de PorfP2, 100 mg de CMC e 12 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_AL por 50 mg de extrato de PorfP2 e 100 mg de AL, PorfP2_PcT_Gli por 50 mg de extrato de PorfP2, 100 mg de AL e 12 μ L de glicerol 86-88%. Nos moldes de 56,75 cm² a solução filmogénica do filme PorfP2 foi constituída por 250 mg de extrato de PorfP2, PorfP2_Gli por 250 mg de extrato de PorfP2 e 30 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_PcT por 250 mg de extrato de PorfP2 e 250 mg de PcT, PorfP2_PcT_Gli por 250 mg de extrato de PorfP2, 250 mg de PcT e 30 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_CMC por 250 mg de extrato de PorfP2 e 250 mg de CMC, PorfP2_PcT_Gli por 250 mg de extrato de PorfP2, 250 mg de CMC e 30 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_AL por 125 mg de extrato de PorfP2 e 250 mg de AL, PorfP2_PcT_Gli por 125 mg de extrato de PorfP2, 250 mg de AL e 30 μ L de glicerol 86-88%. Nos moldes de 153,94 cm² a solução filmogénica do filme PorfP2 foi constituída por 680 mg de extrato de PorfP2, PorfP2_Gli por 680 mg de extrato de PorfP2 e 81,6 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_PcT por 680 mg de extrato de PorfP2 e 680 mg de PcT, PorfP2_PcT_Gli por 680 mg de extrato de PorfP2, 680 mg de PcT e 81,6 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_CMC por 680 mg de extrato de PorfP2 e

680 mg de CMC, PorfP2_PcT_Gli por 680 mg de extrato de PorfP2, 680 mg de CMC e 81,6 μ L de glicerol 86-88%; PorfP2_AL por 340 mg de extrato de PorfP2 e 680 mg de AL, PorfP2_PcT_Gli por 340 mg de extrato de PorfP2, 680 mg de AL e 81,6 μ L de glicerol 86-88%.

2.5. Ensaios Morfológicos e Mecânicos

Os ensaios morfológicos e mecânicos foram efetuados pela Professora Doutora Mafalda Guedes e pelo Professor Doutor Ricardo Baptista, docentes do Instituto Politécnico de Setúbal e investigadores em centros de investigação sediados no Instituto Superior Técnico, onde decorreram as medidas. Os filmes analisados foram o PorfP2, PorfP2_Gli, PorfP2_PcT, PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_CMC, PorfP2_CMC_Gli, PorfP2_AL e PorfP2_AL_Gli, tendo sido desenvolvidos três filmes com as amostras S8, S9 e S10 de PorfP2 e os componentes PcT, CMC, AL e Gli, independentes, analisados em ensaios independentes.

2.5.1. Caracterização morfológica

A morfologia dos filmes foi estudada por microscopia eletrónica de varrimento (Laboratório de Microscopia Eletrónica, MicroLab) (SEM), perfilometria laser (Laboratório de Materiais Nanoestruturados, NanoMATLab) e medição de espessura. Para observação por microscopia eletrónica de varrimento por emissão de campo (FEG-SEM, Jeol JSM-7001F) as amostras foram previamente revestidas com liga de Au-Pd, para evitar acumulação de carga elétrica durante a observação. Mediu-se a rugosidade média (R_a) dos filmes por perfilometria laser Profilm 3D (Filmetrics, Milpitas, Califórnia, EUA). Cada ensaio consistiu no varrimento pelo feixe laser de linhas com 1 mm de comprimento e orientação aleatória. Os resultados foram adquiridos e tratados com o *software* ProfilmOnline (Filmetrics, Milpitas, Califórnia, EUA). Analisaram-se pelo menos 3 amostras de cada composição e 3 linhas em cada amostra, para avaliação de reprodutibilidade. Adicionalmente, determinou-se a espessura dos filmes. A respetiva

densidade foi primeiro medida, via método de Arquimedes por imersão em etanol absoluto (Fisher Chemical, Hampton, New Hampshire, EUA) ($d = 0,789 \text{ g.cm}^{-3}$). Utilizaram-se amostras circulares ($\varnothing 8 \text{ mm}$), que foram previamente pesadas em balança analítica (AND 200). Mediram-se pelo menos 4 amostras de cada composição, para verificação da reprodutibilidade de resultados. Os valores obtidos foram depois utilizados para calcular a espessura média.

2.5.2. Ensaio Mecânicos

O desempenho mecânico foi avaliado por ensaio de tração (Laboratório de Biomecânica de Lisboa, LBL), caracterizando-se o módulo de elasticidade aparente, tensão de cedência e resistência mecânica. Utilizou-se uma máquina de ensaios universal eletromecânica 5544 (INSTRON, Norwood, Massachusetts, EUA), equipada com uma célula de carga (INSTRON, Norwood, Massachusetts, EUA) de 100 N e um vídeo extensómetro SVE I (INSTRON, Norwood, Massachusetts, EUA). Os ensaios foram realizados até à fratura das amostras, com uma velocidade de 1 mm/min, tendo sido calculado o módulo de Young e a tensão de rotura das amostras, de acordo com a norma ASTM D638 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*). Foram utilizadas pelo menos 3 ($n=3..6$) amostras com 15 mm de largura e 50 mm de comprimento útil (utilizado pelo vídeo extensómetro). Para o cálculo do módulo de Young (E) foi utilizada apenas a parte linear elástica da curva de tensão-extensão, sendo E definido com o declive linear da curva. A tensão de rotura foi determinada como a tensão máxima obtida antes da fratura da amostra.

2.6. Ensaio Sensoriais

A partir dos filmes PorfP2_AL_Gli, PorfP2_PcT_Gli e PorfP2_CMC_Gli foram formadas embalagens, ao qual foram adicionados no seu interior bolas de cereais com chocolate (Dia, Las Rozas, Madrid, Espanha) e as embalagens foram seladas (Figura A 3). Após um período de dois meses, foram realizadas provas triangulares de análise sensorial,

com metodologia baseada em Meilgaard et al. (1999). O painel de provadores contou com 12 participantes, cada participante foi convidado a provar conjuntos de 3 amostras, sendo 2 iguais e 1 diferente. De seguida, definiu-se quais amostras eram semelhantes e a diferente. Na distinção das embalagens em prova, foram realizadas 6 réplicas por provador com ordem aleatória; e 3 réplicas na comparação com o controlo (embalado em polietileno), todas as amostras foram comparadas com as restantes e com o controlo.

2.7. Tratamento estatístico

A análise estatística deu-se por testes ANOVA com um fator. No caso de diferenças estatisticamente significativas, realizou-se o teste de comparação múltipla Tukey, quando os requisitos, aleatoriedade, número de amostragens, normalidade (teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste Brown-Forsythe), foram cumpridos. E, quando não foram cumpridos, realizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn. Os testes apresentam uma significância de 5% e recorreram a análise pelo *software* GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). As representações gráficas foram desenvolvidas recorrendo ao *software* GraphPad Prism 8.0.2.

A visão geral das várias etapas experimentais desenvolvidas nesta dissertação encontra-se esquematizada na Figura 2.2.

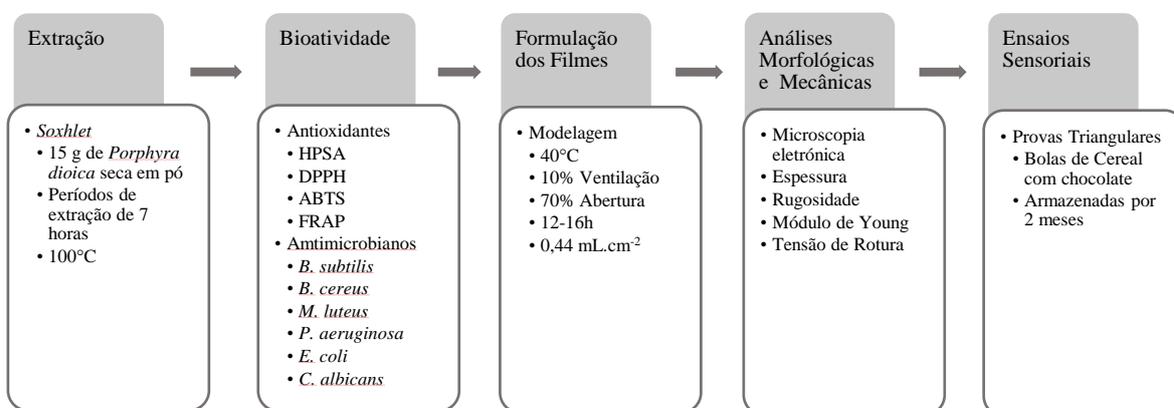


Figura 2. 2 – Fluxograma dos procedimentos e análises aplicados sequencialmente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Extração

Na extração houve a tentativa de obtenção de porfirano semi-refinado a partir de *Porphyra dioica* obtendo o maior rendimento possível, com uma metodologia limpa com a possibilidade de ser aplicada em *scale-up*.

De forma a cumprir estes parâmetros foi selecionado como solvente água, pois é um “solvente verde” e de baixo custo, que, quando aquecido, demonstrou elevada eficiência na extração de polissacarídeos sulfatados de algas, além de alguns destes polissacarídeos serem solúveis apenas em água quente (Gómez-Ordóñez et al., 2014). A aplicação do sistema *Soxhlet* foi selecionada pois permite a utilização do solvente referido e promove uma extração sólido-líquido, em que o coletor e o extrator se encontram separados, não havendo, por este motivo, um contacto direto entre a alga e o conteúdo extraído. Desta forma, a contaminação no extrator por material não solubilizado é muito baixa, assim o extrato obtido é constituído quase exclusivamente por componentes solubilizados no solvente selecionado, reduzindo a probabilidade de possíveis contaminações no extrato (Garcia-Vaquero et al., 2020), além deste sistema permitir a automatização e a aplicação de *scale-up* (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010). As principais desvantagens deste método estão na necessidade de um período de tempo alargado para extração e uso de energia elétrica (Garcia-Vaquero et al., 2020).

Os procedimentos desenvolvidos, PorfP1 e PorfP2, apresentam metodologias semelhantes, descritos no ponto 2.1., distinguem-se pela fração descartada, pois no PorfP1 a fração descartada (2h1F), corresponde às duas primeiras horas de extração, tendo em conta que o conteúdo presente no coletor é removido a cada fração, e no PorfP2 a fração descartada (1h1F), corresponde apenas à primeira hora de extração. A fração descartada é importante devido a possível presença de outros contaminantes solúveis sobre a alga. No entanto, como observado na Figura 3.1, os espectros obtidos pelos processos PorfP1 e PorfP2 são muito

semelhantes, o que sugere que, após o período de 1 hora inicial, a grande parte dos contaminantes referidos já se encontram desassociados (Akhtar et al., 2018).

O processo PorfP2 apresentou o maior rendimento (Tabela 3.1), e ambos os procedimentos produzem extratos muito semelhantes (Figura 3.1). Desta forma, o procedimento adotado e aplicado nos restantes ensaios foi o PorfP2. Além de apenas as frações 7h1F e 7h2F (primeiras duas frações de sete horas) serem consideradas, uma vez que as restantes frações apresentam rendimentos muito inferiores e utilizam os mesmos recursos limitadores ressaltados acima (tempo e energia). Desta forma, a Tabela 3.2 representa a composição do extrato obtido pelo procedimento PorfP2 nas frações 7h1F e 7h2F, assim como nas restantes análises.

Tabela 3. 1 – Rendimento obtido a partir de 15 g de *Porphyra dioica* em pó pelos processos PorfP1 (extrações com extrator *Soxhlet* com descarte da fração das duas primeiras horas de extração, 2h1F, seguida de frações consecutivas de sete horas, 7h1F, 7h2F, 7h3F, 7h4F) e PorfP2 (extrações com extrator *Soxhlet* com descarte da fração da primeira hora de extração, 1h1F, seguida de frações consecutivas de sete horas, 7h1F, 7h2F, 7h3F, 7h4F).

Fração	PorfP1S1					PorfP2S1				
	2h1F•	7h1F	7h2F	7h3F	7h4F	1h1F•	7h1F	7h2F	7h3F	7h4F
Rendimento (%)	4,36	8,69	5,36	2,09	1,58	1,78	17,82	8,78	1,76	0,88
		14,05					26,60			

•Fração descartada

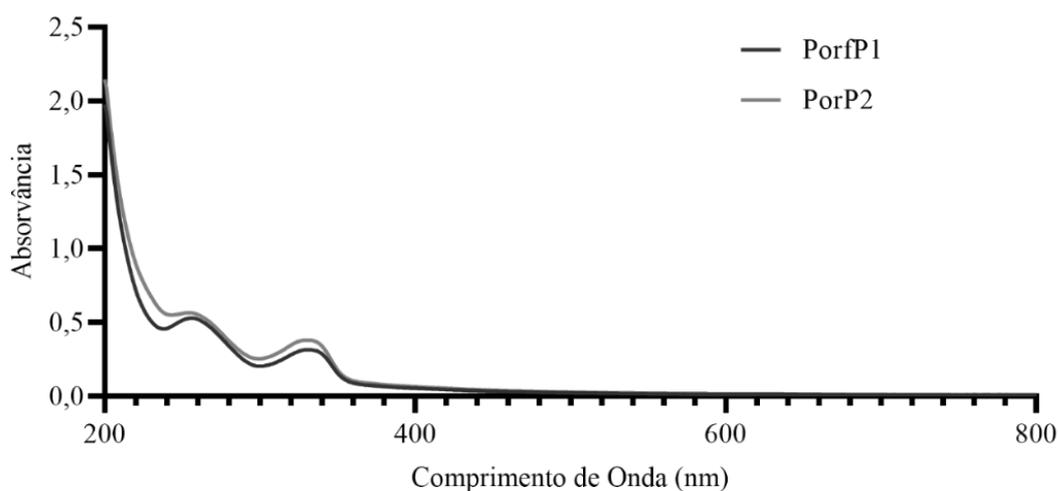


Figura 3. 1 – Espectro de absorvância em UV-Visível entre 200 e 800 nm em células de quartzo (percurso ótico de 1 cm) dos extratos a $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ extraídos pelos procedimentos PorfP1 (descarte das duas primeiras horas) e PorfP2 (descarte da primeira hora).

O rendimento obtido no processo PorfP2 é muito elevado, 26,63% como observado na Tabela 3.2, quando comparando com outros métodos reconhecidos e aplicados, como a extração com solventes orgânico, etanol 85%, com rendimento de 10,6% (Isaka et al., 2015), os métodos mais recentes, como a aplicação de fluidos supercríticos, que gera extratos muito purificados porém com rendimento muito baixos mesmo com a aplicação de assistência de ultrassons, 6,24%, e recursos financeiros muito elevados (Yu et al., 2015). Até mais elevado que os métodos de aplicação direta de solvente com água quente com rendimento de apenas 17,6% (D. He et al., 2019).

O PorfP2 apresenta-se como um procedimento reproduzível, pois as diferenças de rendimentos, concentração de D-galactose e fenóis totais das amostras da extração, Tabela 3.2 e Figura 3.3, não são estatisticamente significativas, além de apresentar espectros que se sobrepõem (Figura 3.2).

Tabela 3. 2 – Caracterização dos principais componentes presentes nos extratos obtidos pelo processo de extração PorfP2 das amostras S1, S2 e S4, sendo consideradas as frações 7h1F e 7h2F.

PorfP2	Rendimento (%)	[Proteínas] (%)	[D-Galactose] (%)	Fenóis Totais (Eq. de ácido gálico $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de Extrato)
PorfP2	26,66 \pm 0,27	*ND	67,74 \pm 4,13	0,616 \pm 0,027

*ND – Não Detetado.

Os valores representam a média \pm erro padrão da média de três ensaios independentes realizadas em triplicado ou quadruplicados.

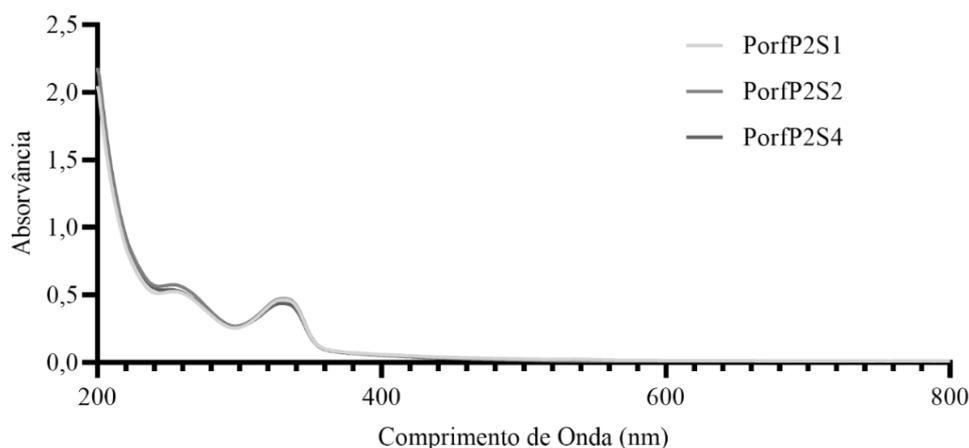


Figura 3. 2 – Espectro de absorvância em UV-Visível entre 200 e 800 nm em células de quartzo (percurso ótico de 1 cm) das frações 7h1F e 7h2F, duas primeiras frações de sete horas após a fração descartada, das amostras PorfP2S1, PorfP2S2 e PorfP2S4.

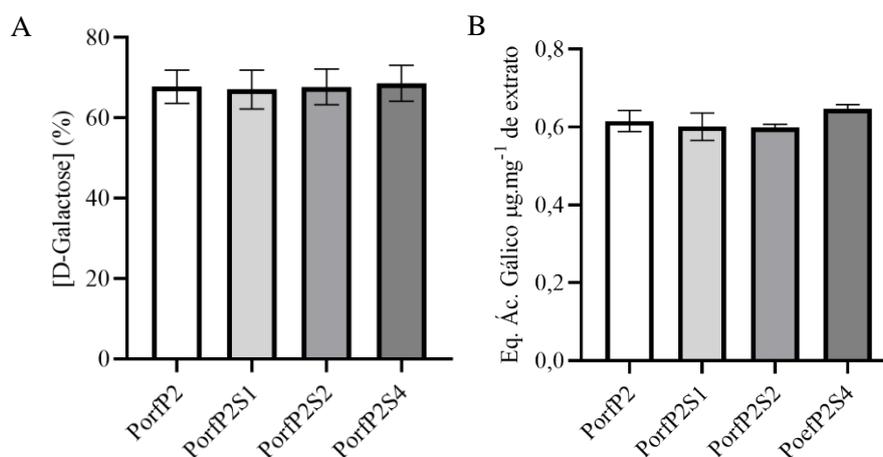


Figura 3. 3 – Composição dos extratos obtidos pelo processo PorfP2 analisados nas amostras S1, S2 e S4, em termos de concentração de D-galactose (%) (A), e quantificação total de fenóis (equivalentes de ácido gálico $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato) (B). Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

Apesar de reprodutível, o extrato apresenta contaminantes, pois o espectro de absorvância dos extratos das amostras de PorfP2 analisados são muito semelhantes aos reportados para porfirano puro comercial (Akhtar et al., 2018) porém com um pico adicional a 330 nm. A presença de outros componentes em extratos de porfirano semi-refinado deve-se à associação de diversos compostos ao porfirano que compõem a estrutura da parede celular, pois esta apresenta uma estrutura muito complexa e heterogênea (Rahman, 2016). Este pico pode ser originado pela possível presença de alguns tipos de fenóis como o ácido clorogênico presente nas algas do género *Porphyra* em concentrações consideráveis, (3,016 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), com absorvância máxima nesta zona (Lee et al., 2021; Navarra et al., 2017), ou outros fenóis presentes em algas vermelhas, como os ligados às suas paredes celulares deslocados por arrastamento com os restantes componentes (Klejdus et al., 2017). Esta hipótese é fortalecida pela presença de fenóis detetado através do método TPC com reagente Folin-Ciocalteu, apesar de não ser uma reação de deteção exclusiva para fenóis, abrindo a possibilidade de interferência de outros compostos (Ainsworth & Gillespie, 2007). Existem outros metabolitos secundários, como os *mycosporine-like amino acids* (MAAs), que podem apresentar absorvâncias entre os 310-360 nm, uma vez que este é o principal comprimento de onda da radiação UVA e UVB (Nishida et al., 2020). Estes metabolitos são assim os principais responsáveis por muitos extratos de algas apresentarem picos nesta gama de observâncias, incluindo algas vermelhas (Navarro, 2015).

Além de apresentar um grau de contaminação por proteínas desprezável, inferior ao limite de deteção do método utilizado, especialmente relevante quando comparado com o procedimento de extração com um rendimento mais próximo, 17,6%, que o obtido pelo PorfP2, com concentração de proteína entre 1,1-0,4% (D. He et al., 2019). Apresenta uma concentração de D-galactose, 67,74% peso seco, próxima do esperado para porfirano puro (Bojko et al., 2020).

Na elaboração do método de extração torna-se ainda importante na análise da reprodutibilidade dos extratos quanto às suas bioatividades. Pois extratos provenientes da mesma fonte, com a mesma metodologia de extração e sobre as mesmas condições devem apresentar bioatividades idênticas de forma a serem previsíveis, para que os procedimentos

possam ser aplicados em grande escala (Izzo et al., 2020). Assim, como nas análises bioquímicas, foram testados três extratos independentes, PorfP2S1, PorfP2S2 e PorfP2S4, extraídos pelo processo selecionado acima, PorfP2.

Os ensaios de potencial antioxidante, Figura 3.4 e 3.5, demonstram a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes amostras de PorfP2, este fenómeno é observado inclusivamente em mecanismos de ação antioxidantes diferentes.

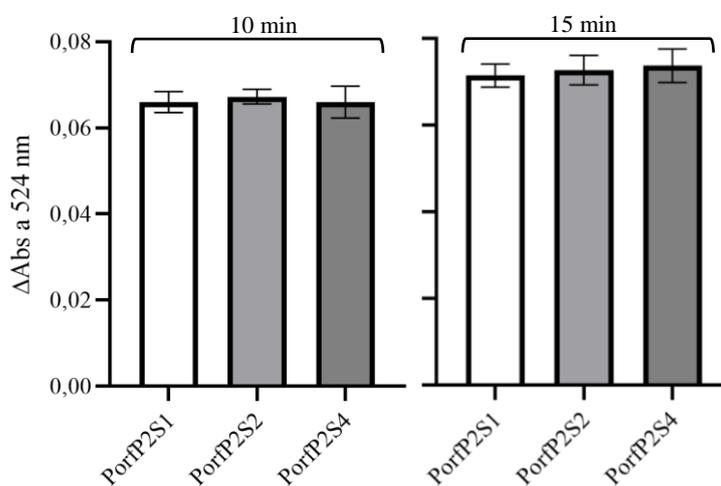


Figura 3. 4 – Variação da absorvância a 524 nm através do ensaio HPSA após 10 minutos (esquerda) e 15 minutos (direita) em meio reacional contendo $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extratos das amostras S1, S2 e S4 extraídos pelo processo PorfP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

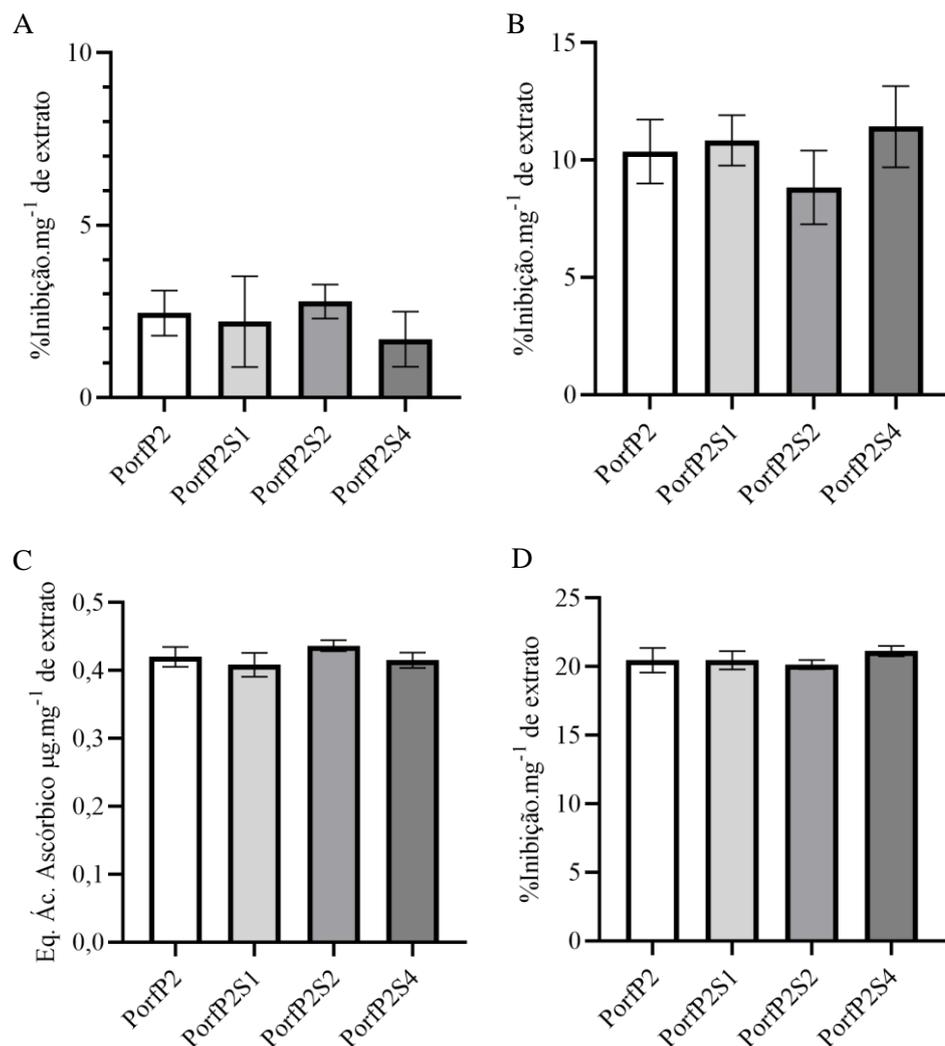


Figura 3. 5 – Ensaio da potencial antioxidante por DPPH diluído em metanol (A), DPPH diluído em acetonitrilo (B), FRAP (C) e ABTS (D) dos extratos PorfP2S1, PorfP2S2 e PorfP2S4, amostras do procedimento PorfP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

A presença de efeitos antioxidantes deve-se aos compostos presentes nos extratos e à sua organização e interação. Apesar do desconhecimento da sua total composição, devido à grande semelhança de atividades é muito provável que as condições citadas se repitam em todos os extratos, reforçando a presença de reprodutibilidade do método desenvolvido.

3.2. Composição dos filmes

Numa abordagem inicial foram realizados apenas filmes com porfirano, glicerol e cloreto de cálcio. Os filmes contendo cloreto de cálcio, foram desenvolvidos na tentativa de formação de filmes mais resistentes devido às interações de *crosslinking* (Cian et al., 2015), porém estes não foram considerados para análise posteriores devido ao excesso de absorção de água da atmosfera o que comprometia a estrutura dos filmes. Por este motivo, foram desenvolvidas soluções filmogénicas com diversos componentes, na tentativa de estabelecer um material compósito com propriedades físicas e mecânicas melhoradas.

Assim, a partir das propriedades mecânicas, resistência a humidade atmosférica, transparência e coloração, os filmes PorfP2_PcT, PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_CMC, PorfP2_CMC_Gli, PorfP2_AL e PorfP2_AL_Gli, representados na Tabela 2.1, foram selecionados para serem estudados de forma mais aprofundada, as restantes formulações testadas podem ser consultadas na Tabela A1, desta forma os componentes analisados são os presentes nas soluções filmogénicas dos mesmos.

3.2.1. Avaliação da capacidade Antioxidante dos componentes dos filmes

Na análise da atividade antioxidante é necessário ter em conta os diferentes tipos de mecanismo, aos quais podem ser associadas ações que levam à diminuição das reações de oxidação numa determinada solução (Gijsman, 2012). Estes são principalmente os mecanismos de decomposição e neutralização de espécies reativas de oxigénio (ROS), geradas por peróxido de hidrogénio, que se dá por ação de compostos com carácter antioxidante como os álcoois e compostos com grupos fosfato (Rong & Sun, 2015), e mecanismos de transferência de um único eletrão do agente antioxidante para a espécie radical, mecanismo principalmente associado a fenóis (Gijsman, 2012). Os processos destacados acima são quantificados pelo HPSA (Figura 3.6), no primeiro mecanismo referido, e pelo DPPH, FRAP e ABTS (Figura 3.7), para o segundo mecanismo.

Alguns hidratos de carbono, como o carragenano (Yuan et al., 2006) e a glicose (Cherkas et al., 2020), apresentam potencial antioxidante contra ROS gerados por H₂O₂ (HPSA). Assim como observado no porfirano semi-refinado (PorfP2), que apresenta potencial antioxidante, tanto após 10 minutos com 15 minutos, ambos com *p-value* de inferiores a 0,0001, quando comparado com o controlo, esta atividade deve-se à semelhança da presença e localização de grupos funcionais hidroxilo com os álcoois, que são reconhecidos pela sua atividade de neutralizar espécie reativa de oxigénio, em determinadas concentração, podendo se tornar pró-oxidantes após esse limite (McDonough, 2003). A ação antioxidante pode resultar da cedência de catiões H⁺ a radicais OH• ou da captação de grupos O₂⁻ • (Wan et al., 2013). Sendo estas as principais espécies promotoras da oxidação nos organismos, com grande impacto negativo na sua saúde.

O processo no caso da ação do glicerol, quando comparado com o controlo (*p-value*<0,0001), é muito semelhante. No entanto, destaca-se do porfirano (*p-value*<0,0001) por apresentar não só um maior número de grupos hidroxilo, como uma forma mais disponível e com maior facilidade de reação dos mesmos, aspeto que é comumente explorado no processo de derivatização do mesmo (Ayude et al., 2019), apesar da sua atividade ser menos duradora ao longo do tempo, apresentado variações maiores entre os 10 minutos e os 15 minutos quando comparando com o porfirano e a glicose. Na pectina a relação mantém-se, *p-value* de inferiores a 0,0001, quando comparado com o controlo e com o porfirano. No entanto, por ser pectina destinada ao uso alimentar, possui na sua composição, além de glicose, pirofosfato ácido de sódio e fosfato tricálcio que apresentam grupos fosfato, tendo estes um grande potencial na captação de espécies radicais de oxigénio (Gijnsman, 2012), o que justifica o seu elevado potencial antioxidante (Gijnsman, 2012). No caso da carboximetilcelulose de sódio e do alginato, houve a promoção da oxidação, provavelmente devido aos grupos carboxilato presentes em ambos os compostos que reage com o ácido acético, presente como moderador da reação de oxidação, formando acetato; ou H₂O₂, formando hidroperóxido. A formação de hidroperóxido na presença de complexo de ferro(III), poderá favorecer a decomposição do H₂O₂, via reações de Fenton não controladas (Jeon & Hong, 2019; Mas-Ballesté & Que, 2007).

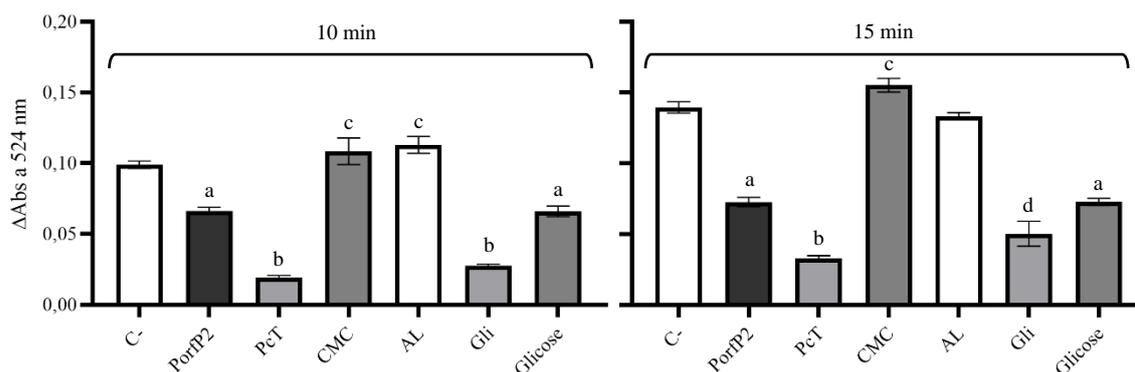


Figura 3. 6 – Variação da absorvância a 524 nm através do ensaio HPSA após 10 minutos (esquerda) e 15 minutos (direita) em meio reacional contendo pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC), alginato de sódio (AL), glicerol 86-88% (Gli) a $1,2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e porfirano semi-refinado extraído pelo processo PorFP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

Na Figura 3.7 são apresentados os resultados aos ensaios de DPPH diluído em metanol (A) e em acetonitrilo (B), de FRAP (C) e de ABTS (D), pois os seus mecanismos de reação são muito semelhantes, todos consistem, como já foi referido, na doação de um próton à espécie reativa. O DPPH em metanol devido a apresentar limites de deteção mais elevados, não apresenta uma compatibilidade tão grande com os restantes ensaios, no entanto apresenta a mesma tendência. Nos ensaios realizados de DPPH em metanos e em acetonitrilo, FRAP e ABTS, o único componente que apresenta diferenças estatisticamente significativas, com uma significância de 5%, para com o controlo, é o porfirano ($p\text{-value} < 0,0001$ em todos os ensaios). Os restantes componentes não apresentaram atividade. Porém, o reagente no método ABTS reagir muito mais rápido, em relação aos restantes métodos (Dudonné et al., 2009), o que influencia nas diferenças na deteção, por este motivo, na presença de reagentes mais rápidos, como o ABTS, há a perceção de uma inibição desigual.

O potencial antioxidante do porfirano semi-refinado destaca-se. No entanto, o mecanismo de redução detetado nestes ensaios não era esperado em polissacarídeos sulfatados como o porfirano, mas em fenóis e outros metabolitos secundário (Gijssman, 2012). Desta forma, o mais provável é que esta ação não derive do porfirano mas de outras moléculas associadas à parede celular *Porphyra dioica*, devido a esta ser uma estrutura muito coesa, complexa e heterogénea (Rahman, 2016), como referido no ponto 3.1. e como

observado na quantificação total de fenóis e nos espectros de absorvância do PorfP2 (Tabela 3.2 e Figura 3.2).

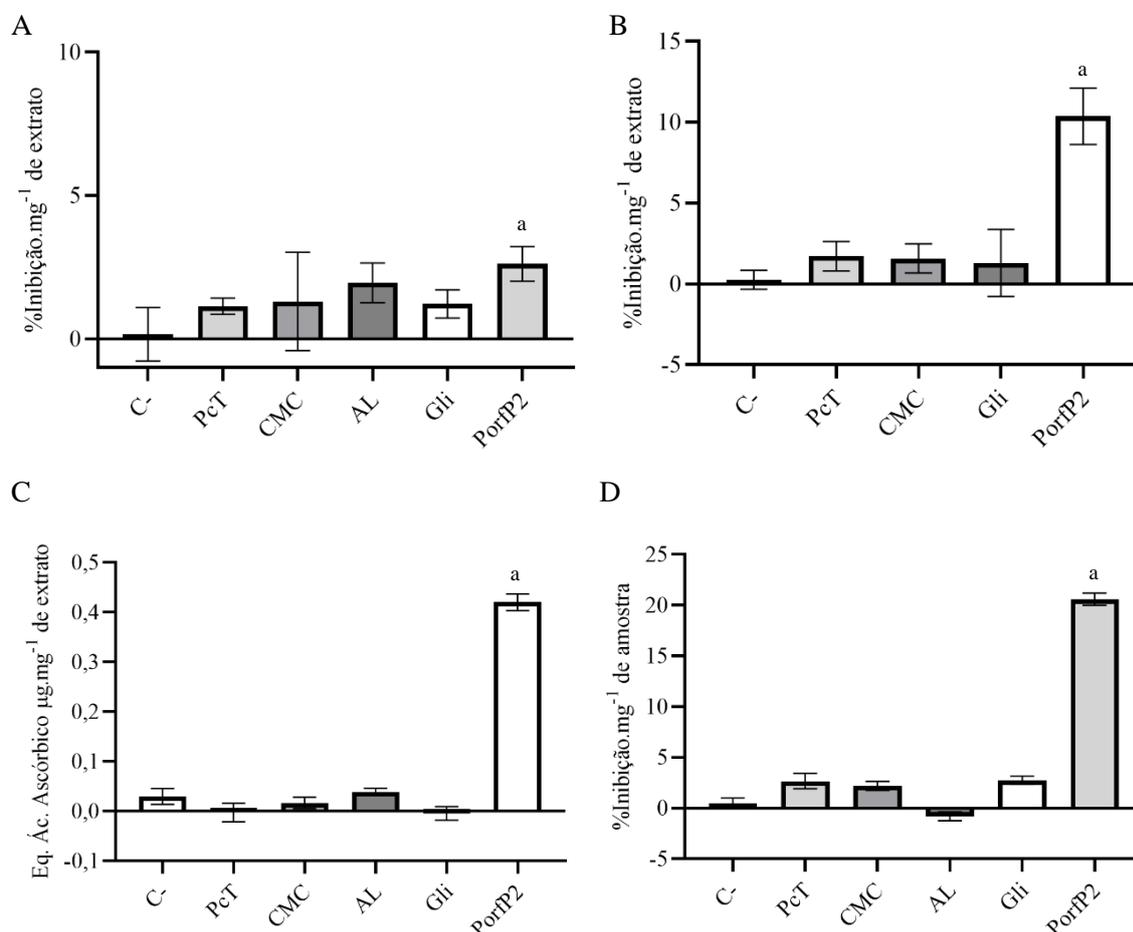


Figura 3. 7 – Ensaio da potencial antioxidante por DPPH diluído em metanol (A), DPPH diluído em acetonitrilo (B), FRAP (C) e ABTS (D) de pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC), alginato de sódio (AL), glicerol 86-88% (Gli) a 1,2 µL.mL⁻¹ e porfirano semi-refinado extraído pelo processo PorfP2. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

Outro ponto importante a ressaltar é a importância da aplicação de vários ensaios na determinação do potencial antioxidante pois, além dos diferentes mecanismos, a velocidade de reação (DPPH e FRAP são mais lentos que o ABTS) e a resolução do método (DPPH em diferentes solventes) podem levar a conclusões erradas, que só podem ser evitadas pela análise dos diferentes métodos em conjunto, resultando num perfil antioxidante mais completo (Apak, 2019).

3.2.2. Antibiogramas dos componentes dos filmes

Nos ensaios antimicrobianos recorreu-se a testes de difusão em agar, sendo que este é um procedimento intermédio, pois caso tivessem sido detetados halos de inibição, teriam sido desenvolvidos procedimentos de forma a determinar a concertação mínima inibitória dos compostos em estudo. No entanto, como observado na Tabela 3.3, nenhum extrato de porfirano semi-refinado apresentou inibição para qualquer das estirpes testadas. O mesmo se passou com os restantes componentes utilizados na elaboração dos filmes.

Tabela 3. 3 – Comprimento do diâmetro dos halos (mm) de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* por 30 µg de cloranfenicol em bactéria e 25 µg de fluconazol em fungos (Controlo Positivo), 200 µg de extratos das amostras S1, S2 e S4 extraídos pelo processo PorfP2), pectina alimentar industrial (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC) e alginato de sódio (AL).

Comprimento do diâmetro dos halos (mm)				
	Controlo Positivo	PorfP2S1	PorfP2S2	PorfP2S4
<i>Bacillus subtilis</i>	29,66	*ND	*ND	*ND
<i>Bacillus cereus</i>	32,33	*ND	*ND	*ND
<i>Micrococcus luteus</i>	30,00	*ND	*ND	*ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,66	*ND	*ND	*ND
<i>Escherichia coli</i>	31,00	*ND	*ND	*ND
<i>Candida albicans</i>	40,66	*ND	*ND	*ND
	PcT	CMC	AL	
<i>Bacillus subtilis</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Bacillus cereus</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Micrococcus luteus</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Escherichia coli</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Candida albicans</i>	*ND	*ND	*ND	

A ausência de atividades antimicrobianas era a esperada para este tipo de extratos, pois os polissacarídeos sulfatados, como o porfirano, não demonstraram este potencial

anteriormente, no entanto esta análise é importante, uma vez que atividades antimicrobianas já foram detetadas em extratos de água quente de algas vermelhas, especialmente sobre bactérias Gram-positivas (Abou Zeid et al., 2014; Bhuyar et al., 2020). Os restantes componentes dos filmes, PcT, CMC e AL, também não demonstraram atividade antimicrobiana, o porfirano não foi até à data, relatado como agente antimicrobiano (Espitia et al., 2014; Y. Han et al., 2018).

3.3. Filmes

As análises do potencial antioxidante e antimicrobiano dos filmes foram desenvolvidos com amostras de filmes que passaram pelo processo descrito no ponto 2.4. dissolvidos em água destilada. As embalagens dos filmes aplicados nos ensaios sensoriais foram desenvolvidas a partir dos filmes PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_CMC_Gli e PorfP2_AL_Gli, e os cereais removidos da embalagem original e embalados novamente com uma diferença máxima de 30 minutos entre a primeiro e o último embalamento.

3.3.1. Avaliação da capacidade Antioxidante dos filmes

Assim como nos ensaios individuais, os filmes contendo porfirano e pectina apresentaram elevado potencial antioxidante em HPSA, inibindo a oxidação após 10 e 15 minutos (Figura 3.8), diferenciando-se do controlo de forma estatisticamente significativa (*p-value* inferior a 0,0001 em ambos os casos), apesar do filme com porfirano, glicose e pectina apresentar uma diminuição das atividades quando comparado com o filme apenas com porfirano e pectina (*p-value* = 0,0223 e *p-value* = 0,0304 para 10 e 15 minutos respetivamente), sugere que o glicerol não se encontra ativo, assim como nos filmes PorfP2_CMC_Gli e PorfP2_AL_Gli, e assim como o porfirano nesses filmes. Os compósitos de CMC e AL com PorfP2 demonstraram atividade nula, provavelmente devido à prevalência do carácter pró-oxidante dos componentes CMC e AL, como observado em 3.2.

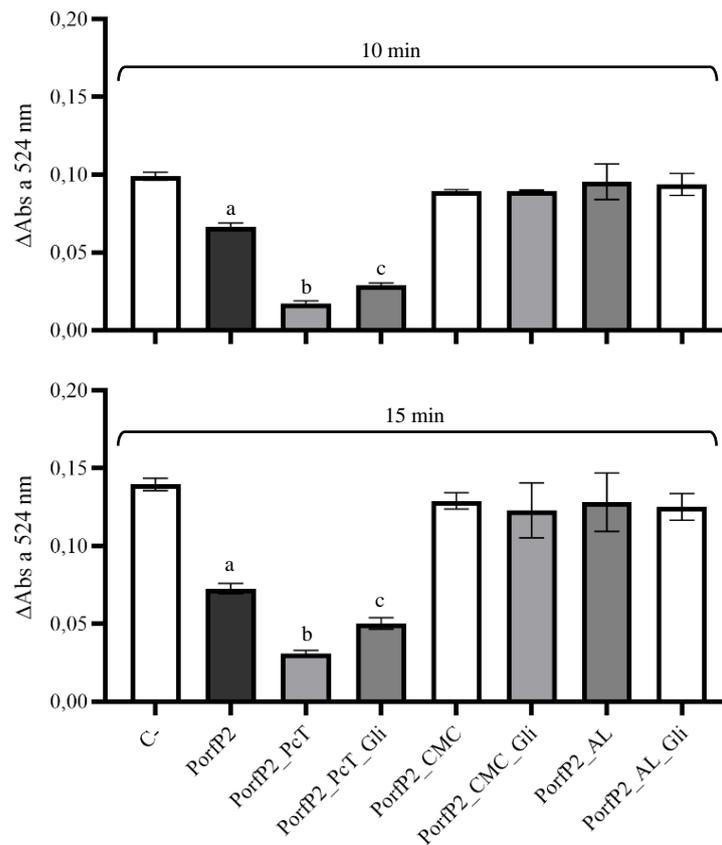


Figura 3. 8 – Variação da absorvância a 524 nm através do ensaio HPSA após 10 minutos (cima) e 15 minutos (baixo) em meio reacional contendo amostras dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e porfirano semi-refinado. Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

Na análise do DPPH, tanto dissolvido em metanol (Figura 3.9 A) como dissolvido em acetonitrilo (Figura 3.9 B), há novamente o facto acima referido, em que apesar do elevado potencial antioxidante do porfirano, este não é observado em nenhum dos filmes na qual este é um componente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os filmes PorfP2_PcT, PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_CMC, PorfP2_CMC_Gli, PorfP2_AL e PorfP2_AL_Gli, (*p-value* igual a 0,9994; 0,9999; 0,9834; 0,9875 e 0,7719 respetivamente). No entanto, o mesmo não se repete no ABTS e no FRAP, o que indica que provavelmente o fator responsável por não ter havido a deteção da atividade antioxidante

destes filmes é o limite de detecção alto dos métodos de DPPH aplicados, quando comparado com os restantes métodos (Foti, 2015).

O método de FRAP demonstra uma atividade dos filmes proporcional à sua composição de PorfP2 (Figura 3.9 C), tendo os filmes PorfP2_PcT, PorfP2_PcT_Gli e PorfP2_CMC_Gli, sensivelmente metade da atividade do PorfP2, $0,207 \pm 0,028$; $0,168 \pm 0,049$; $0,180 \pm 0,016$ e $0,420 \pm 0,014$, equivalentes de ácido ascórbico $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato respetivamente, e PorfP2_AL e PorfP2_AL_Gli sensivelmente um quarto, $0,106 \pm 0,014$, equivalentes de ácido ascórbico $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato e $0,113 \pm 0,010$ equivalentes de ácido ascórbico $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato respetivamente, (Tabela A 2). Esta proporcionalidade direta indica que a ação antioxidante detetada, deriva dos componentes presentes no extrato PorfP2, com uma ação nula ou mínima dos restantes componentes do filme. Havendo como exceção o filme PorfP2_CMC, que apresenta uma atividade superior e estatisticamente significativa, em relação aos restantes filmes com proporções de PorfP2 semelhantes, sugerindo a existência de uma relação de sinergia entre o CMC e os componentes presente no extrato PorfP2. Esta ação pode ser resultante da interação do grupo funcional $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ presente na carboximetilcelulose de sódio que torna os fenóis mais reativos, promovendo o aumento das interações com os radicais (J. Chen et al., 2020).

No ensaio com ABTS a tendência da proporcionalidade com a concentração de PorfP2 ($20,46 \pm 0,90\%$ de inibição. mg^{-1} de extrato) observada no ensaio de FRAP mantém-se (Figura 3.9 D). No caso dos filmes PorfP2_PcT, PorfP2_PcT_Gli e PorfP2_CMC_Gli e PorfP2_CMC ($7,51 \pm 1,31$; $6,62 \pm 0,41$; $7,09 \pm 0,84\%$ e $10,02 \pm 0,49\%$ de inibição. mg^{-1} de extrato respetivamente) sensivelmente metade; e para os filmes PorfP2_AL e PorfP2_AL_Gli é sensivelmente um quarto ($6,84 \pm 1,54$ e $5,36 \pm 0,52\%$ de inibição. mg^{-1} de extrato respetivamente). A proporcionalidade é menos nítida em ABTS, pois os componentes apresentarem velocidades de reação mais lentas. Por este motivo, devido ao ensaio de ABTS ter um período de reação muito curto, a reação não se deu na totalidade, sendo que a tendência do método é igualar-se ao observado em FRAP (Dudonné et al., 2009).

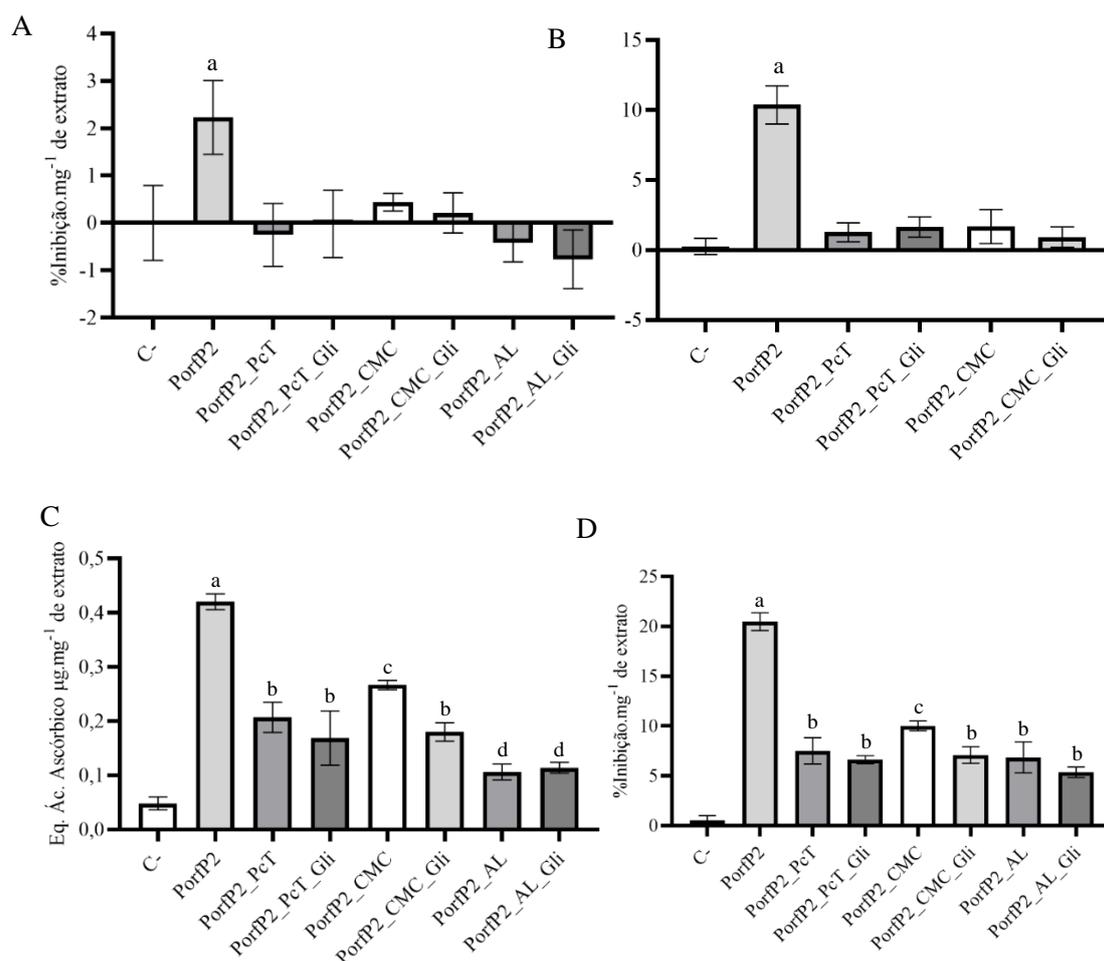


Figura 3. 9 – Ensaio da potencial antioxidante por DPPH diluído em metanol (A), DPPH diluído em acetonitrilo (B), FRAP (C) e ABTS (D) de amostra dissolvida em água destilada dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli). Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

O potencial antioxidante apresentado pelo PorfP2, mesmo em filme é muito elevado, e é provavelmente a sua ação que é detetada, quando observado o potencial antioxidante dos filmes que este compõe. Esta ação pode ser inibida por outras moléculas através da captação dos fenóis e outros metabolitos presentes no extrato, responsáveis pela sua ação antioxidante (V́ctor-Ortega et al., 2016). Outro fator a ter em conta e que pode ter influência na deteção, é a formação espontânea de radicais carregados, devido à elevada complexidade presente nos filmes, resultando em alguns casos na neutralização dos fenóis, principalmente com mais

peso nos filmes com PcT e CMC (Vuolo et al., 2019), podendo ser este outro motivo para a reação menos intensa nos ensaios de ABTS.

3.3.2. Antibiógramas das soluções filmogénicas

Os filmes testados, assim como os seus componentes individuais, não apresentaram potencial antimicrobiano (Tabela 3.4). Estes ensaios sugerem a inexistência de uma relação de sinergia entre os componentes dos filmes, em relação à promoção da inibição da proliferação microbiana que ainda pudesse existir e que atribuisse propriedades antimicrobianas aos filmes desenvolvidos.

Tabela 3. 4 – Comprimento do diâmetro dos halos (mm) de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* por 30 µg de cloranfenicol em bactéria e 25 µg de fluconazol em fungos (Controlo Positivo), 200 µg de amostra dissolvida em água Milli-Q® dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli).

Comprimento do diâmetro dos halos (mm)

	Controlo Positivo	PorfP2_CMC	PorfP2_CMC_Gli	PorfP2_PcT
<i>Bacillus subtilis</i>	29,66	*ND	*ND	*ND
<i>Bacillus cereus</i>	32,33	*ND	*ND	*ND
<i>Micrococcus luteus</i>	30,00	*ND	*ND	*ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,66	*ND	*ND	*ND
<i>Escherichia coli</i>	31,00	*ND	*ND	*ND
<i>Candida albicans</i>	40,66	*ND	*ND	*ND
	PorfP2_PcT_Gli	PorfP2_AL	PorfP2_AL_Gli	
<i>Bacillus subtilis</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Bacillus cereus</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Micrococcus luteus</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Escherichia coli</i>	*ND	*ND	*ND	
<i>Candida albicans</i>	*ND	*ND	*ND	

3.3.3. Propriedades morfológicas dos filmes

Os filmes PorfP2_PcT, PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_CMC, PorfP2_AL, PorfP2_AL_Gli e PorfP2 são homogêneos e uniformes à escala macroscópica. No entanto, a observação das respectivas superfícies por microscopia eletrônica mostra a presença de alguns defeitos e heterogeneidades (Figura 3.10).

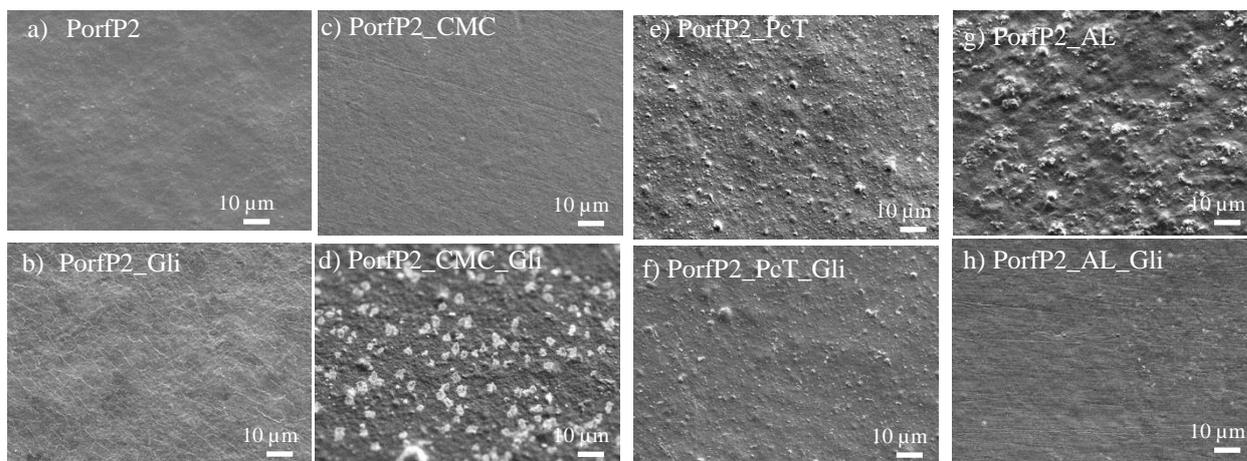


Figura 3. 10 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes de a) porfirano semi-refinado (PorfP2), b) porfirano semi-refinado e glicerol 86-88% (PorfP2_Gli), c) porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), d) porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), e) porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), f) porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), g) porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL) e h) porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli).

Os filmes com porfirano sem a adição de outros componentes, filme PorfP2 (Figura 3.10 a) e PorfP2_Gli (Figura 3.10 b), apresentam aparentemente a superfície suave. No entanto, em observação com maior ampliação (Figura 3.11), o filme PorfP2_Gli mostra uma estrutura em camadas sobrepostas (Figura 3.11 a), resultante provavelmente de contração, devido à perda de água nos interstícios da matriz, pois, como a secagem se deu de forma sequencial, houve a formação das estruturas observadas (Han & Aristippos, 2005).

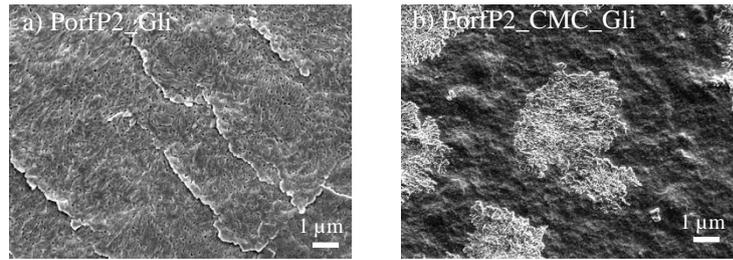


Figura 3. 11 – Imagens SEM: (a) detalhe da estrutura em camadas sobrepostas em PorfP2_Gli; (b) estrutura bifásica em PorfP2_CMC_Gli.

A adição de CMC resulta em filme uniforme (Figura 3.10 c). No entanto, o filme PorfP2_CMC_Gli (Figura 3.10 d) destaca-se dos restantes por apresentar estrutura bifásica (Figura 3.11 b). A presença de segunda fase é comumente associada a polímeros lineares: as cadeias simples e relativamente curtas facilitam a formação e o enrolamento, destacando-se da matriz. Este processo pode ter sido desencadeado por interações de repulsão com o glicerol (Wu et al., 2011). A formação destas estruturas resulta em elevada rugosidade superficial em comparação com os outros filmes produzidos (Figura 3.12 A). Entre os filmes sem glicerol, PorfP2_PcT (Figura 3.10 e) e PorfP2_AL (Figura 3.10 g) apresentam maior rugosidade superficial (Figura 3.12 A). Isto resulta provavelmente da formação de bolhas durante a formação das soluções filmogénicas e da secagem dos filmes, retidos devido à elevada viscosidade das soluções filmogénicas. Os filmes PorfP2_CMC (Figura 3.10 c), PorfP2_AL (Figura 3.10 g) e PorfP2 (Figura 3.10 a) mostram riscos (devidos às irregularidades nos moldes) e bolhas de pequena dimensão, resultantes da libertação de gases durante a secagem. De facto, durante o processo de secagem a perda de água leva à contração da matriz, provocando a redução da área do filme; sendo a secagem temporalmente desigual, dá-se a separação de fragmentos formando sobreposições (Zabihi et al., 2015). Com exceção dos filmes aditivados com alginato (Figura 3.10 g) e h), todos os sistemas apresentam rugosidade média, mais elevada na presença de glicerol (Figura 3.12 a). A espessura média dos filmes varia entre $25,22 \pm 3,56 \mu\text{m}$ para PorfP2 e $61,78 \pm 1,78 \mu\text{m}$ para PorfP2_PcT_Gli (Figura 3.12 b). Novamente, todos os filmes apresentam espessura média mais elevada na presença de glicerol, com exceção do sistema aditivado com alginato.

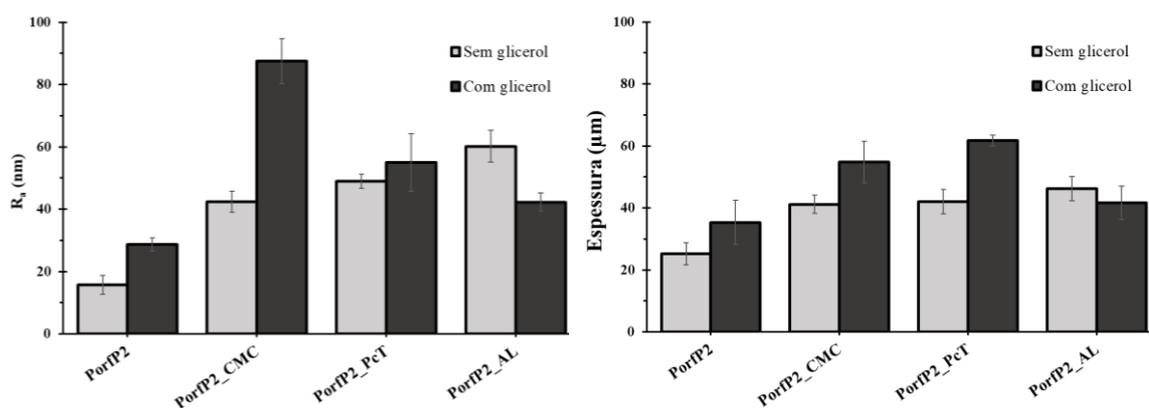


Figura 3. 12 – Caracterização morfológica dos filmes produzidos; (A) valor médio de rugosidade (R_a) superficial; (B) espessura média.

3.3.4. Propriedades mecânicas dos filmes

A tensão de rotura (Figura 3.13 A) indica a carga máxima que determinado material pode sofrer imediatamente antes do seu ponto de fratura. Apesar de esperado, os filmes contendo glicerol não sofreram uma redução estatisticamente significativa da sua tensão de rotura, quando comparado o PorfP2_PcT com PorfP2_PcT_Gli ($p\text{-value} = 0,9892$) e PorfP2_AL com PorfP2_AL_Gli ($p\text{-value} = 0,0965$). Este ponto não se aplica ao PorfP2 com o PorfP2_Gli ($p\text{-value} = 0,0332$), devido principalmente à presença excessiva de moléculas de água nas matrizes, pois tanto o porfirano como o glicerol têm como principal característica a absorção de água, formando matrizes com demasiado distanciamento entre as cadeias (Cian et al., 2015), como observado por microscopia eletrónica.

A determinação do módulo de Young (Figura 3.13 B) demonstrou, como esperado, uma maior elasticidade (visível através de uma redução do seu módulo de Young) dos filmes contendo glicerol, quando comparados com os seus semelhantes sem glicerol (Ganesan et al., 2018), PorfP2 com PorfP2_Gli ($p\text{-value} < 0,0001$), PorfP2_PcT com PorfP2_PcT_Gli ($p\text{-value} < 0,0001$) e PorfP2_AL com PorfP2_AL_Gli ($p\text{-value} < 0,0001$), além de ser perceptível o aumento de elasticidade promovido pela adição do porfirano semi-refinado às formulações, pois o filme contendo apenas porfirano semi-refinado apresenta melhores propriedades elásticas comparativamente aos filmes com pectina e alginato (PorfP2 com

PorfP2_PcT e PorfP2 com PorfP2_AL apresentam *p-value* de 0,0047 e 0,0004 respectivamente). A única exceção é entre os filmes de PorfP2_CMC e PorfP2_CMC_Gli, isto pode dever-se, como observados na análise microscópica, a não ter havido a interação entre o glicerol e a carboximetilcelulose de sódio, ou a algum problema estrutural do próprio filme de PorfP2_CMC, uma vez que a tensão de rotura deste é relativamente baixa e inferior à do filme PorfP2_CMC_Gli. Estes fatores indicam que as interações entre os componentes da matriz não se dão da forma esperada, com pontes de hidrogénio ou mesmo reticulações entre as cadeias (Y. Han et al., 2018).

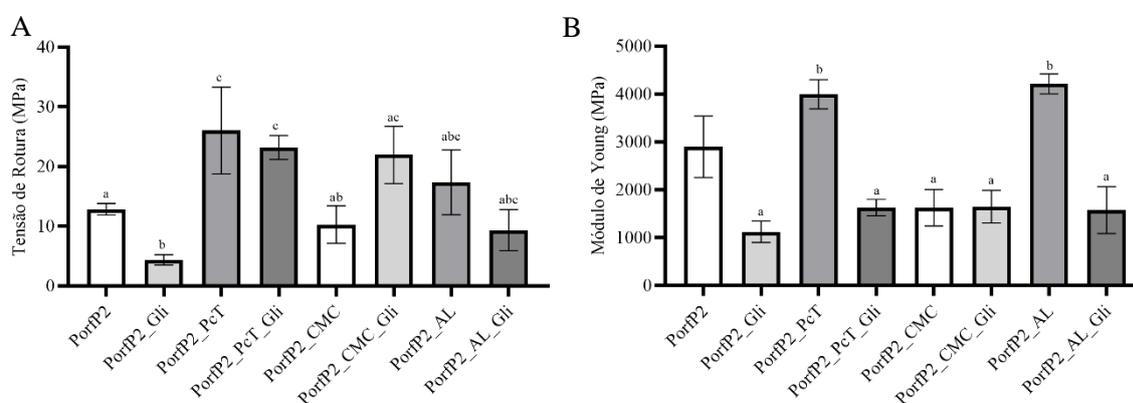


Figura 3. 13 – Ensaios das propriedades mecânicas de tensão de rotura (A) e módulo de Young (B) dos filmes de porfirano semi-refinado (PorfP2), porfirano semi-refinado e glicerol 86-88% (PorfP2_Gli), porfirano semi-refinado e pectina alimentar industrial (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli). Letras minúsculas na zona superior das barras simbolizam as diferenças estatisticamente significativas com significância de 5%.

Estes ensaios demonstram claramente a importância da adição de PorfP2 às estruturas, aumentando a elasticidade sem uma perda muito elevada da resistência máxima, devendo-se à formação de uma estrutura muito ramificada que interage através de pontes de hidrogénio e equilíbrios eletrostáticos com formação de interações de Van der Waals, apresentando moléculas de água no interior das matrizes, conferindo-lhes a elasticidade (Espitia et al., 2014; Meng et al., 2018; F. Zhang et al., 2017). O filme que apresentou as melhores características físicas e mecânicas foi o PorfP2_PcT_Gli.

3.3.5. Ensaio sensoriais

Os ensaios sensoriais foram realizados em provas triangulares, de forma a detetar a existência de precessão de provadores, representando os consumidores, na deteção de diferenças sensoriais em produtos alimentares (bolas de cereais com chocolate), embalados por dois meses nas embalagens produzidas, com os filmes PorfP2_CMC_Gli, PorfP2_PcT_Gli, PorfP2_AL_Gli e polipropileno (controlo). A comparação foi realizada entre os diversos filmes, e dos filmes com o controlo, sendo os dados analisados segundo a metodologia de Meilgaard et al. (1999).

Na Figura 3.14 observa-se o número de respostas corretas na distinção entre os filmes, à esquerda, e dos filmes com os controlos, à direita, assim como o número crítico de respostas corretas (coluna preta). Este ponto representa o número de respostas corretas a partir do qual, com uma significância de 5%, se identifica a existência de perceção da diferença. Assim, pela Figura 3.14 e pela Tabela A 2, observa-se a inexistência da perceção, seja na comparação dos filmes entre si, seja na comparação dos filmes com o controlo (Meilgaard et al., 1999).

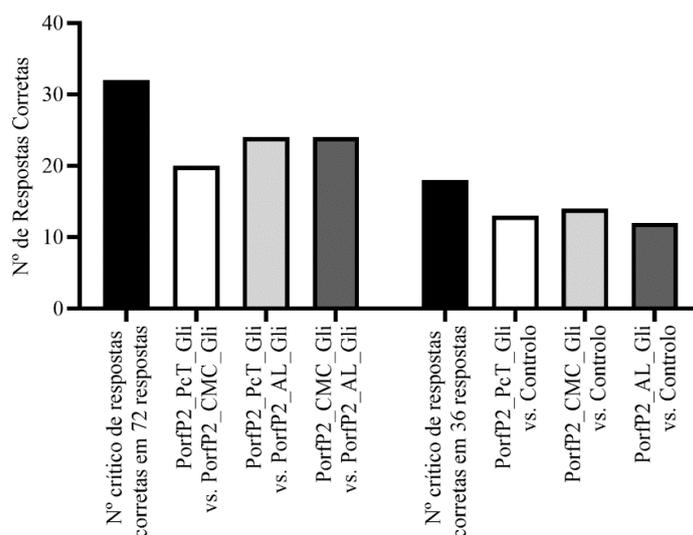


Figura 3. 14 – Número de respostas corretas na diferenciação através de análise sensorial de bolas de cereais com chocolate embalados nos filmes de porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_AL_Gli) e em polipropileno (controlo).

Este é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de embalagens, uma vez que é necessário garantir a manutenção das propriedades físicas e químicas dos produtos alimentares, especialmente as que afetam a percepção sensorial dos mesmos, como a coloração, o odor, a textura e principalmente o sabor (Marsh & Bugusu, 2007; Reboleira et al., 2020).

4. Conclusão

O desenvolvimento de novos materiais, cada vez mais, deve ter em conta o impacto ambiental de todas as etapas de processamento, começando na origem e forma de extração da matéria-prima até ao desenvolvimento da matriz, de forma a reduzir os impactos gerados. Como referido, o plástico de origem fóssil, apesar da sua aplicabilidade, não cumpre nenhuma dessas exigências, gerando impactos bem visíveis e significativos na saúde humana e nos ecossistemas, assistindo-se a uma tendência de agravamento, cada vez mais significativa.

Visando estes conceitos, durante o desenvolvimento deste projeto, houve a tentativa de desenvolver um método de extração eficaz, pouco poluente e a partir de matéria-prima disponível e regenerável. Este ponto foi atingido com o processo de extração PorfP2, um método que permite a extração de porfirano semi-refinado por *Soxhlet* a partir de uma alga abundante e de cultivo rápido e fácil, *Porphyra dioica*, com um solvente verde, água quente, e um rendimento elevado, 26,66%, além de ser um método reprodutível e com potencial de *scale-up*. Sendo a principal limitação a necessidade de uma fonte de calor por longos períodos de tempo, resultando na utilização de muita energia elétrica e produção de poluição térmica. Através das análises bioquímicas e das bioatividades, considerou-se este como sendo um processo reprodutível, uma vez que todos os extratos apresentaram as mesmas características, no entanto, seria importante desenvolver uma análise bioquímica mais aprofundada de forma a determinar todos os elementos presentes no extrato, elucidando ainda a estrutura do porfirano (conformação, ramificações e peso molecular, entre outros).

No desenvolvimento dos filmes foi aplicado o mesmo princípio, estabelecendo um processo com a utilização, mais uma vez, apenas de energia térmica na sua elaboração, não tendo havido a aplicação de nenhum agente reticulante e mantendo a solução filmogénica o menos complexa possível, com a obtenção de filmes resistentes à humidade e gases atmosféricos, permitindo a sua aplicação. Os principais filmes desenvolvidos, PorfP2_CMC_Gli, PorfP2_PcT_Gli e PorfP2_AL_Gli, demonstraram resistência, elasticidade elevadas e durabilidade ao longo do tempo em que foram analisados, mantendo as suas propriedades químicas e físicas, mesmo sujeitos a atmosfera e a deslocamentos. Os filmes foram capazes de armazenar/embalar o alimento testado por um período de tempo considerável, mantendo as propriedades originais do alimento de forma tão eficaz como as embalagens tradicionais, além de apresentarem propriedades bioativas, nomeadamente com ação antioxidante, o que deverá garantir a manutenção dessa qualidade por um período de tempo maior. O principal destaque foi o PorfP2_PcT_Gli, pois as suas bioatividades foram equiparadas (DPPH, ABTS e FRAP) ou muito superiores (HPSA), às restantes soluções filmogénicas, em que o filme apresentou as melhores propriedades mecânicas (Tensão de Ruptura e Módulo de Young). No entanto, futuramente, de modo que se possa considerar estes filmes como substituintes do plástico comum, é necessário a realização de uma gama maior de ensaios mecânicos, como os ensaios de migração (de acordo com Regulamentos da Comissão Europeia n.º 10/2011), a determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água, as taxas de permeabilidade ao O₂ e CO₂, entre outros.

Desta forma, foi possível o desenvolvimento de um processo de fabrico, desde a obtenção da matéria-prima até ao produto final, com exceção dos componentes comerciais, para a produção de um biomaterial com potencial para ser incorporado como um substituinte do plástico de origem fóssil, mas com as características ambientais e de prevenção da saúde exigidas de forma correta pela sociedade.

5. Referências

- Aadil, K. R., Prajapati, D., & Jha, H. (2016). Improvement of physico-chemical and functional properties of alginate film by Acacia lignin. *Food Packaging and Shelf Life*, *10*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.09.002>
- Abdellatef, H. E., & Khalil, H. M. (2003). Colorimetric determination of gabapentin in pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *31*(1), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00572-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00572-1)
- Abdul Khalil, H. P. S., Chong, E. W. N., Owolabi, F. A. T., Asniza, M., Tye, Y. Y., Rizal, S., Nurul Fazita, M. R., Mohamad Haafiz, M. K., Nurmiati, Z., & Paridah, M. T. (2019). Enhancement of basic properties of polysaccharide-based composites with organic and inorganic fillers: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, *136*(12), 47251. <https://doi.org/10.1002/app.47251>
- Abdul Khalil, H. P. S., Saurabh, C. K., Tye, Y. Y., Lai, T. K., Easa, A. M., Rosamah, E., Fazita, M. R. N., Syakir, M. I., Adnan, A. S., Fizree, H. M., Aprilia, N. A. S., & Banerjee, A. (2017). Seaweed based sustainable films and composites for food and pharmaceutical applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *77*(September 2016), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.025>
- Abou Zeid, A. H., Aboutabl, E. A., Sleem, A. A., & El-Rafie, H. M. (2014). Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities. *Carbohydrate Polymers*, *113*, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.004>
- Adão, P., Reboleira, J., Teles, M., Santos, B., Ribeiro, N., Teixeira, C. M., Guedes, M., Pessoa, J. C., & Bernardino, S. (2021). Enhancement of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Porphyrin through Chemical Modification with Tyrosine Derivatives. *Molecules*, *26*(10), 2916. <https://doi.org/10.3390/molecules26102916>
- Ahmed, S., & Ikram, S. (2016). Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *163*, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023>
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, *2*(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Akhtar, H. M. S., Riaz, A., Hamed, Y. S., Abdin, M., Chen, G., Wan, P., & Zeng, X. (2018). Production and characterization of CMC-based antioxidant and antimicrobial films enriched with chickpea hull polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.090>
- Akinrinde, A. S., Afolayan, A. J., & Bradley, G. (2018). Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of *Dianthus Thunbergii* Hooper and *Hypoxis Argentea* Harv Ex Baker: Plants Used for the Management of Diabetes Mellitus in Eastern Cape, South Africa. *Pharmacognosy Magazine*, *14*(54), 195–202. https://doi.org/10.4103/pm.pm_157_17
- Al-Taher, F., & Nemzer, B. (2018). Determination and Quantitation of Residual Solvents in Natural Food Ingredients Using a Static Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detection and Mass Spectrometric Detection Method. *Journal of Food Protection*, *81*(10), 1573–1581. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-142>
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, *97*(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Albeck-Ripka, L. (2018). The ‘Great Pacific Garbage Patch’ Is Ballooning, 87,000 Tons of Plastic and Counting. *The New York Times*, 8. <https://www.nytimes.com/2018/03/22/climate/great-pacific-garbage-patch.html>
- Ali, U., Bijalwan, V., Basu, S., Kesarwani, A. K., & Mazumder, K. (2017). Effect of β -glucan-fatty acid esters on microstructure and physical properties of wheat straw arabinoxylan films. *Carbohydrate Polymers*, *161*, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.036>

- Alimba, C. G., & Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68(February), 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.001>
- Amin, A. S., & El-Didamony, A. M. (2003). Colorimetric Determination of Benzocaine, Lignocaine and Procaine Hydrochlorides in Pure Form and in Pharmaceutical Formulations Using *p*-Benzoquinone. *Analytical Sciences*, 19(10), 1457–1459. <https://doi.org/10.2116/analsci.19.1457>
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M., & Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *LWT*, 92(November 2017), 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.041>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Apak, R. (2019). Current Issues in Antioxidant Measurement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9187–9202. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03657>
- Arvanitoyannis, I. S., & Bosnea, L. (2004). Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 63–76. <https://doi.org/10.1080/10408690490424621>
- Asadi, S., & Pirsa, S. (2020). Production of Biodegradable Film Based on Polylactic Acid, Modified with Lycopene Pigment and TiO₂ and Studying Its Physicochemical Properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(2), 433–444. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01618-5>
- Awoyinka, O. A., Balogun, I. O., & Ogunnowo, A. A. (2007). Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(3), 63–65.
- Ayude, M. A., Doumic, L. I., Cassanello, M. C., & Nigam, K. D. P. (2019). Clean Catalytic Oxidation for Derivatization of Key Biobased Platform Chemicals: Ethanol, Glycerol, and Hydroxymethyl Furfural. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58(35), 16077–16095. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00977>
- Balestri, E., Menicagli, V., Vallerini, F., & Lardicci, C. (2017). Biodegradable plastic bags on the seafloor: A future threat for seagrass meadows? *Science of The Total Environment*, 605–606, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.249>
- Barreto, W. J., de Aquino, M., & Zaia, D. A. M. (1990). A New Method for Total Protein Determination. *Analytical Letters*, 23(7), 1279–1290. <https://doi.org/10.1080/00032719008054353>
- Bedoux, G., Caamal-Fuentes, E., Boulho, R., Marty, C., Bourgougnon, N., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2017). Antiviral and Cytotoxic Activities of Polysaccharides Extracted from Four Tropical Seaweed Species. *Natural Product Communications*, 12(6), 1934578X1701200. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200602>
- Bektaşoğlu, B., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2008). Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC. *Talanta*, 77(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.043>
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., & Reyes, J. E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>
- Berczyński, P., Kładna, A., Kruk, I., Sari, E., Murat, H. N., Dündar, O. B., & Aboul-Enein, H. Y. (2017). Synthesis and in vitro antioxidant activity study of some new piperazinyl flavone compounds. *Luminescence*, 32(8), 1431–1441. <https://doi.org/10.1002/bio.3342>
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, I., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>

- Bhatia, S., Rathee, P., Sharma, K., Chaugule, B. B., Kar, N., & Bera, T. (2013). Immuno-modulation effect of sulphated polysaccharide (porphyran) from *Porphyra vietnamensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.012>
- Bhatia, S., Kumar, V., Sharma, K., Nagpal, K., & Bera, T. (2014). Significance of Algal Polymer in Designing Amphotericin B Nanoparticles. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2014/564573>
- Bhatia, S., Nagpal, K., Bera, T., Sharma, A., & Sharma, K. (2015). Evaluation of pharmacognostical, phytochemical and anti-microbial properties of *Porphyra vietnamensis*. *International Journal of Green Pharmacy*, 9(2), 131. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.155065>
- Bhatia, S., Sharma, K., Sharma, A., Nagpal, K., & Bera, T. (2015a). Anti-inflammatory, Analgesic and Antiulcer properties of *Porphyra vietnamensis*. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(1), 69–77. <https://doi.org/10.22038/ajp.2014.3758>
- Bhatia, S., Sharma, K., Nagpal, K., & Bera, T. (2015b). Investigation of the factors influencing the molecular weight of porphyran and its associated antifungal activity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(2), 153–168. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.005>
- Bhuyar, P., Rahim, M. H., Sundararaju, S., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of red seaweed; *Kappaphycus alvarezii* against pathogenic bacteria. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 6(1), 47–58. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2020.01.04>
- Bito, T., Teng, F., & Watanabe, F. (2017). Bioactive Compounds of Edible Purple Laver *Porphyra* sp. (Nori). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(49), 10685–10692. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04688>
- Blouin, N. A., Brodie, J. A., Grossman, A. C., Xu, P., & Brawley, S. H. (2011). Porphyra: a marine crop shaped by stress. *Trends in Plant Science*, 16(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.10.004>
- Blouin, N., Calder, B. L., Perkins, B., & Brawley, S. H. (2006). Sensory and fatty acid analyses of two Atlantic species of *Porphyra* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 18(1), 79–85. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9017-3>
- Bojko, L., de Jonge, G., Lima, D., Lopes, L. C., Viana, A. G., Garcia, J. R., Pessôa, C. A., Wohnrath, K., & Inaba, J. (2020). Porphyran-capped silver nanoparticles as a promising antibacterial agent and electrode modifier for 5-fluorouracil electroanalysis. *Carbohydrate Research*, 498(July), 108193. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108193>
- Bolumar, T., Andersen, M. L., & Orlien, V. (2011). Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chemistry*, 129(4), 1406–1412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.082>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brandsch, J., & Piringer, O. (2008). Characteristics of Plastic Materials. In O. G. Piringer & A. L. Baner (Eds.), *Plastic Packaging* (pp. 15–61). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527621422.ch2>
- Briassoulis, D., & Degli Innocenti, F. (2017). Standards for Soil Biodegradable Plastics. In M. Malinconico (Ed.), *Soil Degradable Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture* (pp. 139–168). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54130-2_6
- Broom, J. E., Nelson, W. A., Yarish, C., Jones, W. A., Aguilar Rosas, R., & Aguilar Rosas, L. E. (2002). A reassessment of the taxonomic status of *Porphyra suborbiculata*, *Porphyra carolinensis* and *Porphyra lilliputiana* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *European Journal of Phycology*, 37(2), 227–235. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003566>
- Cao, J., Wang, S., Yao, C., Xu, Z., & Xu, X. (2016). Hypolipidemic effect of porphyran extracted from *Pyropia yezoensis* in ICR mice with high fatty diet. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1315–1322.

<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0637-y>

- Caputo, H. E., Straub, J. E., & Grinstaff, M. W. (2019). Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides. *Chemical Society Reviews*, 48(8), 2338–2365. <https://doi.org/10.1039/C7CS00593H>
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.001>
- Chandía, N. P., & Matsuhira, B. (2008). Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(3), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.023>
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2011). Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 428–436. <https://doi.org/10.1021/jf103896z>
- Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., & Kim, C. K. (2020). Author Correction: Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10(1), 5666. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62493-y>
- Chen, S., & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), 726–735. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00199.x>
- Chen, Y., & Xue, Y. (2019). Optimization of microwave assisted extraction, chemical characterization and antitumor activities of polysaccharides from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate Polymers*, 206(October 2018), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.093>
- Cherkas, A., Holota, S., Mdzinarashvili, T., Gabbianelli, R., & Zarkovic, N. (2020). Glucose as a Major Antioxidant: When, What for and Why It Fails? *Antioxidants*, 9(2), 140. <https://doi.org/10.3390/antiox9020140>
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L., & Del Nobile, M. A. (2008). Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.002>
- Chinaglia, S., Tosin, M., & Degli-Innocenti, F. (2018). Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. *Polymer Degradation and Stability*, 147(2018), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.12.011>
- Cian, R. E., Fajardo, M. A., Alaiz, M., Vioque, J., González, R. J., & Drago, S. R. (2014a). Chemical composition, nutritional and antioxidant properties of the red edible seaweed *Porphyra columbina*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(3), 299–305. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.854746>
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Drago, S. R., González, R. J., & Mauri, A. N. (2014b). Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. *Food Chemistry*, 146, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.133>
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2015). Effect of glycerol and Ca⁺² addition on physicochemical properties of edible carrageenan/porphyran-based films obtained from the red alga, *Pyropia columbina*. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1699–1708. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0449-5>
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Câmara, R. B. G., Nobre, L. T. D. B., Costa, M. S. S. P., Almeida-Lima, J., Farias, E. H. C., Leite, E. L., & Rocha, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.005>
- Costa, E., Azevedo, V., Melo, T., Rego, A., V. Evtuguin, D., Domingues, P., Calado, R., Pereira, R., Abreu, M., & Domingues, M. (2018). High-Resolution Lipidomics of the Early Life Stages of the Red

- Seaweed *Porphyra dioica*. *Molecules*, 23(1), 187. <https://doi.org/10.3390/molecules23010187>
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J. I., Ubeda, B., Gálvez, J. Á., Irigoien, X., & Duarte, C. M. (2015). Plastic Accumulation in the Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121762>
- Cunha, L., & Grenha, A. (2016). Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Marine Drugs*, 14(3), 42. <https://doi.org/10.3390/md14030042>
- Dauvergne, P. (2018). Why is the global governance of plastic failing the oceans? *Global Environmental Change*, 51(December 2017), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.05.002>
- Debeaufort, F., & Voilley, A. (1995). Methyl cellulose-based edible films and coatings I. Effect of plasticizer content on water and 1-octen-3-ol sorption and transport. *Cellulose*, 2(3), 205–213. <https://doi.org/10.1007/BF00813018>
- Derraik, J. G. . (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 842–852. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5)
- Dong, J.-Z., Wang, Z.-C., & Wang, Y. (2011). Rapid extraction of polysaccharides from fruits of *Lycium barbarum* L. *Journal of Food Biochemistry*, 35(4), 1047–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00433.x>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768–1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Ebrahimabadi, A. H., Movahedpour, M. M., Batooli, H., Ebrahimabadi, E. H., Mazoochi, A., & Qamsari, M. M. (2016). Volatile compounds analysis and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Mindium laevigatum*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(12), 1337–1344. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.7921>
- El-Sayed, L., Mohamed, Z. H., & Wahbi, A.-A. M. (1986). Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of cycloserine with *p*-benzoquinone. *The Analyst*, 111(8), 915. <https://doi.org/10.1039/an9861100915>
- Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>
- Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046>
- Feki, A., Bardaa, S., Hajji, S., Ktari, N., Hamdi, M., Chabchoub, N., Kallel, R., Boudawara, T., Nasri, M., & Ben Amara, I. (2020). Falkenbergia rufolanosa polysaccharide – Poly(vinyl alcohol) composite films: A promising wound healing agent against dermal laser burns in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 954–966. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.173>
- Feng, Z., Zhang, T., Wang, J., Huang, W., Wang, R., Xu, J., Fu, G., & Gao, G. (2020). Spatio-temporal features of microplastics pollution in macroalgae growing in an important mariculture area, China. *Science of the Total Environment*, 719, 137490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137490>
- Fernando, I. P. S., Kim, K.-N., Kim, D., & Jeon, Y.-J. (2019). Algal polysaccharides: potential bioactive substances for cosmeceutical applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(1), 99–113. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1503995>
- Fleita, D., El-Sayed, M., & Rifaat, D. (2015). Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1236–1244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.024>

- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Fonseca, R., & Mourão, P. (2006). Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. *Thrombosis and Haemostasis*, 96(12), 822–829. <https://doi.org/10.1160/TH06-06-0304>
- Foti, M. C. (2015). Use and Abuse of the DPPH • Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8765–8776. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03839>
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Qin, X.-S., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2010). Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of 56 Wild Fruits from South China. *Molecules*, 15(12), 8602–8617. <https://doi.org/10.3390/molecules15128602>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
- Ganash, A. A., Al-Nowaiser, F. M., Al-Thabaiti, S. A., & Hermas, A. A. (2013). Protection of stainless steel by the electrodeposition of polyaniline/poly(o-phenylenediamine) composite layers. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 17(3), 849–860. <https://doi.org/10.1007/s10008-012-1940-z>
- Ganesan, A. R., Shanmugam, M., Palaniappan, S., & Rajauria, G. (2018). Development of edible film from *Acanthophora spicifera*: Structural, rheological and functional properties. *Food Bioscience*, 23(October 2017), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.009>
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., & Tiwari, B. (2020). Conventional extraction techniques: Solvent extraction. In *Sustainable Seaweed Technologies* (pp. 171–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00006-8>
- Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., & Gigova, L. (2009). Cancer Protective Action of Polysaccharide, Derived from Red Microalga *Porphyridium Cruentum* —A Biological Background. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(Sup 1), 783–787. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818540>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gijsman, P. (2012). Polymer Stabilization. In *Handbook of Environmental Degradation of Materials* (Second Edi, pp. 673–714). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3455-3.00023-7>
- Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A., & Rupérez, P. (2014). Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.002>
- Hall, M. B. (2013). Efficacy of reducing sugar and phenol–sulfuric acid assays for analysis of soluble carbohydrates in feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 185(1–2), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.008>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters*, 307(1), 108–112. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80911-Y](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80911-Y)
- Halonen, N., Pálvölgyi, P. S., Bassani, A., Fiorentini, C., Nair, R., Spigno, G., & Kordas, K. (2020). Bio-Based Smart Materials for Food Packaging and Sensors – A Review. *Frontiers in Materials*, 7(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00082>
- Han, J.-W., Ruiz-Garcia, L., Qian, J.-P., & Yang, X.-T. (2018). Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 860–877. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12343>
- Han, Jung H., & Aristippos, Gennadios (2005). Edible Films and Coatings: a review. In *Innovations in Food Packaging* (Vol. 15, pp. 239–262). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
- Han, Y., Yu, M., & Wang, L. (2018). Physical and antimicrobial properties of sodium alginate/carboxymethyl cellulose films incorporated with cinnamon essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 15(November 2017), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.11.001>

- Harrison, J. P., Boardman, C., O'Callaghan, K., Delort, A.-M., & Song, J. (2018). Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *Royal Society Open Science*, 5(5), 171792. <https://doi.org/10.1098/rsos.171792>
- Hatada, Y., Ohta, Y., & Horikoshi, K. (2006). Hyperproduction and Application of α -Agarase to Enzymatic Enhancement of Antioxidant Activity of Porphyran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9895–9900. <https://doi.org/10.1021/jf0613684>
- He, D., Wu, S., Yan, L., Zuo, J., Cheng, Y., Wang, H., Liu, J., Zhang, X., Wu, M., Choi, J., & Tong, H. (2019). Antitumor bioactivity of porphyran extracted from *Pyropia yezoensis* Chonsoo2 on human cancer cell lines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(15), 6722–6730. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9954>
- He, J., Xu, L., Yang, L., & Wang, X. (2018). Epigallocatechin Gallate Is the Most Effective Catechin Against Antioxidant Stress via Hydrogen Peroxide and Radical Scavenging Activity. *Medical Science Monitor*, 24, 8198–8206. <https://doi.org/10.12659/MSM.911175>
- Holmes, M. J., & Brodie, J. (2005). Phenology and the life history in culture of *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta) from Britain. *Botanica Marina*, 48(3), 218–230. <https://doi.org/10.1515/BOT.2005.032>
- Isaka, S., Cho, K., Nakazono, S., Abu, R., Ueno, M., Kim, D., & Oda, T. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.043>
- Ishihara, K., Oyamada, C., Matsushima, R., Murata, M., & Muraoka, T. (2005). Inhibitory Effect of Porphyran, Prepared from Dried “Nori”, on Contact Hypersensitivity in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(10), 1824–1830. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1824>
- Iwata, T. (2015). Biodegradable and Bio-Based Polymers: Future Prospects of Eco-Friendly Plastics. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(11), 3210–3215. <https://doi.org/10.1002/anie.201410770>
- Izzo, A. A., Teixeira, M., Alexander, S. P. H., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Insel, P. A., Ji, Y., Kendall, D. A., Panattieri, R. A., Sobey, C. G., Stanford, S. C., Stefanska, B., Stephens, G., & Ahluwalia, A. (2020). A practical guide for transparent reporting of research on natural products in the British Journal of Pharmacology: Reproducibility of natural product research. *British Journal of Pharmacology*, 177(10), 2169–2178. <https://doi.org/10.1111/bph.15054>
- Jancikova, S., Jamróz, E., Kulawik, P., Tkaczewska, J., & Dordevic, D. (2019). Furcellaran/gelatin hydrolysate/rosemary extract composite films as active and intelligent packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.050>
- Jeon, H., & Hong, S. (2019). Peroxide Bond Cleavage of Nonheme Iron-(Hydro/Alkyl)Peroxo Complexes Induced by Endogenous and Exogenous Factors. *Chemistry Letters*, 48(2), 80–85. <https://doi.org/10.1246/cl.180831>
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. (2011). Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196–223. <https://doi.org/10.3390/md9020196>
- Jiao, K., Gao, J., Zhou, T., Yu, J., Song, H., Wei, Y., & Gao, X. (2019). Isolation and purification of a novel antimicrobial peptide from *Porphyra yezoensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12864>
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.014>
- Jindrichova, L., Hoare, A. H., & Hughes, H. (2019). Antimicrobial Properties of Fucus Vesiculosus and *Porphyra dioica* Collected From the Irish Coast. *Science Undergraduate Research Experience Journal*, 1(1).
- Jones, A., Pravadali-Cekic, S., Dennis, G. R., Bashir, R., Mahon, P. J., & Shalliker, R. A. (2017). Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. *Analytica*

Chimica Acta, 967, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.032>

- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.011>
- Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M. B., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioprocess Processing*, 111, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>
- Kim, E.-Y., Choi, Y. H., Lee, J. I., Kim, I.-H., & Nam, T.-J. (2015). Antioxidant Activity of Oxygen Evolving Enhancer Protein 1 Purified from *Capsosiphon fulvescens*. *Journal of Food Science*, 80(6), 1412–1417. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12883>
- Kim, H.-J., Kim, H.-J., & Jang, A. (2019). Nutritional and antioxidative properties of black goat meat cuts. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 8(2), 140–154. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0951>
- Kirsh, I., Frolova, Y., Bannikova, O., Beznaeva, O., Tveritnikova, I., Myalenko, D., Romanova, V., & Zagrebina, D. (2020). Research of the Influence of the Ultrasonic Treatment on the Melts of the Polymeric Compositions for the Creation of Packaging Materials with Antimicrobial Properties and Biodegradability. *Polymers*, 12(2), 275. <https://doi.org/10.3390/polym12020275>
- Klein, A. S., Mathieson, A. C., Neefus, C. D., Cain, D. F., Taylor, H. A., Teasdale, B. W., West, A. L., Hehre, E. J., Brodie, J., Yarish, C., & Wallace, A. L. (2003). Identification of north-western Atlantic *Porphyra* (Bangiales, Bangiaceae) based on sequence variation in nuclear SSU and plastid rbc L genes. *Phycologia*, 42(2), 109–122. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-2-109.1>
- Klejdus, B., Plaza, M., Šnóblová, M., & Lojková, L. (2017). Development of new efficient method for isolation of phenolics from sea algae prior to their rapid resolution liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 135, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.015>
- Knoop, J., Griffin, J. N., & Barrento, S. (2020). Cultivation of early life history stages of *Porphyra dioica* from the British Isles. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01930-6>
- Kwon, M.-J., & Nam, T.-J. (2006). Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sciences*, 79(20), 1956–1962. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.031>
- Lahaye, M., Inizan, F., & Vigoureux, J. (1998). NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 36(2–3), 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00026-5)
- Lambert, S., & Wagner, M. (2017). Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. *Chemical Society Reviews*, 46(22), 6855–6871. <https://doi.org/10.1039/C7CS00149E>
- Lamé, M. W., Jones, A. D., Wilson, D. W., & Segall, H. J. (2003). Protein targets of 1,4-benzoquinone and 1,4-naphthoquinone in human bronchial epithelial cells. *Proteomics*, 3(4), 479–495. <https://doi.org/10.1002/pmic.200390062>
- Langhe, D., & Ponting, M. (2016). Manufacturing and Novel Applications of Multilayer Polymer Films. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02177-6>
- Lee, C. W., Ahn, Y.-T., Zhao, R., Kim, Y. S., Park, S. M., Jung, D. H., Kim, J. K., Kim, H. W., Kim, S. C., & An, W. G. (2021). Inhibitory Effects of *Porphyra tenera* Extract on Oxidation and Inflammatory Responses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/6650037>
- Li, L., Zhao, J., & Tang, X. (2010). Ultraviolet irradiation induced oxidative stress and response of antioxidant system in an intertidal macroalgae *Corallina officinalis* L. *Journal of Environmental Sciences*, 22(5), 716–722. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60168-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60168-6)
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Mamot, S., Ropien, J., & Mazita Mohd, D. (2014). Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 42(P2),

- 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.007>
- Liu, Qing-mei, Xu, S., Li, L., Pan, T., Shi, C., Liu, H., Cao, M., Su, W., & Liu, G. (2017). In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate Polymers*, *165*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.032>
- Liu, Qing, Tang, G.-Y., Zhao, C.-N., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2019). Antioxidant Activities, Phenolic Profiles, and Organic Acid Contents of Fruit Vinegars. *Antioxidants*, *8*(4), 78. <https://doi.org/10.3390/antiox8040078>
- Liu, Z., Gao, T., Yang, Y., Meng, F., Zhan, F., Jiang, Q., & Sun, X. (2019). Anti-Cancer Activity of Porphyrin and Carrageenan from Red Seaweeds. *Molecules*, *24*(23), 4286. <https://doi.org/10.3390/molecules24234286>
- Lu, S., & Yarish, C. (2011). Interaction of photoperiod and temperature in the development of conchocelis of *Porphyra purpurea* (Rhodophyta: Bangiales). *Journal of Applied Phycology*, *23*(1), 89–96. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9541-7>
- Lupetti, K. O., Carvalho, L. C. De, Moura, A. F. de, & Fatibello-Filho, O. (2005). Análise de imagem em química analítica: empregando metodologias simples e didáticas para entender e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais. *Química Nova*, *28*(3), 548–554. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300031>
- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, *1217*(16), 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Mahdavinia, G. R., Irvani, S., Zoroufi, S., & Hosseinzadeh, H. (2014). Magnetic and K⁺-cross-linked kappa-carrageenan nanocomposite beads and adsorption of crystal violet. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, *23*(5), 335–344. <https://doi.org/10.1007/s13726-014-0229-8>
- Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food Packaging-Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, *72*(3), 39–55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012a). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., & Vicente, A. A. (2012b). Synergistic effects between κ -carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, *29*(2), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.004>
- Mas-Ballesté, R., & Que, L. (2007). Iron-Catalyzed Olefin Epoxidation in the Presence of Acetic Acid: Insights into the Nature of the Metal-Based Oxidant. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(51), 15964–15972. <https://doi.org/10.1021/ja075115i>
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Matsui, M. S., Muizzuddin, N., Arad, S., & Marenus, K. (2003). Sulfated Polysaccharides from Red Microalgae Have Antiinflammatory Properties In Vitro and In Vivo. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *104*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1385/ABAB:104:1:13>
- McDonough, K. (2003). Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*, *189*(1–2), 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00155-0)
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (1999). Overall difference tests: does a sensory difference exist between samples? In M. C. Meilgaard, B. T. Carr, & G. V. Civille (Eds.), *Sensory Evaluation Techniques* (3rd ed., pp. 56–95). Taylor & Francis.
- Meng, F., Zhang, Y., Xiong, Z., Wang, G., Li, F., & Zhang, L. (2018). Mechanical, hydrophobic and thermal properties of an organic-inorganic hybrid carrageenan-polyvinyl alcohol composite film. *Composites Part B: Engineering*, *143*(December 2017), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.12.009>

- Miceli, M., Roma, E., Rosa, P., Feroci, M., Loreto, M., Tofani, D., & Gasperi, T. (2018). Synthesis of Benzofuran-2-One Derivatives and Evaluation of Their Antioxidant Capacity by Comparing DPPH Assay and Cyclic Voltammetry. *Molecules*, 23(4), 710. <https://doi.org/10.3390/molecules23040710>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Mucientes, G., & Queiroz, N. (2019). Presence of plastic debris and retained fishing hooks in oceanic sharks. *Marine Pollution Bulletin*, 143(February), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.028>
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108(March), 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
- Nakib, M., Han, D. K., Oshimatsu, T. Y., Memoto, Y. U., Raki, T. A., & Akamoto, S. S. (2009). Effect of Oligosaccharide-rich Supernatant from *Porphyra* with Enzymatic Treatment as a Feed Additive for Black Sea Bream. *Aquaculture Science*, 57(2), 321–327. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.57.321>
- Narancic, T., Verstichel, S., Reddy Chaganti, S., Morales-Gamez, L., Kenny, S. T., De Wilde, B., Babu Padamati, R., & O'Connor, K. E. (2018). Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution. *Environmental Science & Technology*, 52(18), 10441–10452. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02963>
- Navarra, G., Moschetti, M., Guarrasi, V., Mangione, M. R., Militello, V., & Leone, M. (2017). Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy. *Journal of Chemistry*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/6435086>
- Navarro, N. P. (2015). Sunscreens of red algae from Patagonia: a biotechnological perspective. *Pure and Applied Chemistry*, 87(9–10), 953–960. <https://doi.org/10.1515/pac-2015-0406>
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS •+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Ngo, D.-H., & Kim, S.-K. (2013). Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>
- Nielsen, S. S. (2003). Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 39–44). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5250-2_6
- Nieto, M. B. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. In M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 57–112). Springer.
- Nishida, Y., Kumagai, Y., Michiba, S., Yasui, H., & Kishimura, H. (2020). Efficient Extraction and Antioxidant Capacity of Mycosporine-Like Amino Acids from Red Alga Dulse *Palmaria palmata* in Japan. *Marine Drugs*, 18(10), 502. <https://doi.org/10.3390/md18100502>
- Nishiguchi, T., Cho, K., Isaka, S., Ueno, M., Jin, J.-O., Yamaguchi, K., Kim, D., & Oda, T. (2016). Protective effect of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*) on lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1273–1278. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.091>
- Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., & Ngeontae, W. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 44(3), 798–806. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.034>
- Ordoudi, S. A., Tsimidou, M. Z., Vafiadis, A. P., & Bakalbassis, E. G. (2006). Structure–DPPH • Scavenging Activity Relationships: Parallel Study of Catechol and Guaiacol Acid Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5763–5768. <https://doi.org/10.1021/jf060132x>

- Ozen, B. F., & Floros, J. D. (2001). Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends in Food Science and Technology*, 12(2), 60–67. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00053-X)
- Paşcalău, V., Popescu, V., Popescu, G. L., Dudescu, M. C., Borodi, G., Dinescu, A., Perhaița, I., & Paul, M. (2012). The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *Journal of Alloys and Compounds*, 536(SUPPL.1), S418–S423. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2011.12.026>
- Patel, M. R., Piazza, C. C., Layer, S. A., Coleman, R., & Swartzwelder, D. M. (2005). A systematic evaluation of food textures to decrease packing and increase oral intake in children with pediatric feeding disorders. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 38(1), 89–100. <https://doi.org/10.1901/jaba.2005.161-02>
- Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., Van Impe, F., & Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.003>
- Pavlat, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 1–23). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1
- Pereira, M. S., Vilela-Silva, A.-C. E. ., Valente, A.-P., & Mourão, P. A. S. (2002). A 2-sulfated, 3-linked α -l-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydrate Research*, 337(21–23), 2231–2238. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00215-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00215-X)
- Pereira, R., Sousa-Pinto, I., & Yarish, C. (2004). Field and culture studies of the life history of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal. *Phycologia*, 43(6), 756–767. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-6-756.1>
- Pereira, R., Yarish, C., & Sousa-Pinto, I. (2006). The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, 252(1), 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.050>
- Petrova, V. A., Orekhov, A. S., Chernyakov, D. D., Baklagina, Y. G., Romanov, D. P., Kononova, S. V., Volod'ko, A. V., Ermak, I. M., Klechkovskaya, V. V., & Skorik, Y. A. (2016). Preparation and analysis of multilayer composites based on polyelectrolyte complexes. *Crystallography Reports*, 61(6), 945–953. <https://doi.org/10.1134/S1063774516060110>
- Pimentel, F. B., Cermeño, M., Kleekayai, T., Harnedy, P. A., FitzGerald, R. J., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of the red seaweed *Porphyra dioica*. *Food Research International*, 136(228), 109309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109309>
- Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. ., Martins, J. T., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010, October). Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. *Boletim de Biotecnologia*, 17–28.
- Pinotti, A., García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2007). Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.001>
- Pinto e Costa, F. C. (2016). *Bioremoval and biodegradation of organic solvents in aqueous solutions*. Universidade do Milho.
- PlasticsEurope (2020). *Plastics – the Facts 2020: An analysis of European plastics production, demand and waste data* . (24/03/2021) <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>
- Praseptiangga, D., Fatmala, N., Manuhara, G. J., Utami, R., & Khasanah, L. U. (2016). Preparation and preliminary characterization of semi refined kappa carrageenan-based edible film incorporated with cinnamon essential oil. *AIP Conference Proceedings*, 1746(2016), 020036. <https://doi.org/10.1063/1.4953961>
- Qiu, Z. Z., & Chin, K. B. (2020). Physicochemical properties and shelf-life of low-fat pork sausages wrapped

- with active film manufactured by sodium alginate and cherry tomato powder. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(9), 1470–1476. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0132>
- Radonic, A., Thulke, S., Achenbach, J., Kurth, A., Vreemann, A., König, T., Walter, C., Possinger, K., & Nitsche, A. (2010). Anionic Polysaccharides From Phototrophic Microorganisms Exhibit Antiviral Activities to Vaccinia Virus. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals*, 2(4), 51–55. <https://doi.org/10.4172/jaa.1000023>
- Raheem, D. (2013). Application of plastics and paper as food packaging materials-An overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(3), 177. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i3.11509>
- Rahman, M. (2016). An Overview of the Medical Applications of Marine Skeletal Matrix Proteins. *Marine Drugs*, 14(9), 167. <https://doi.org/10.3390/md14090167>
- Ramadas, N. V., Singh, S. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 17–23. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100003>
- Ramos, Ó. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 533–552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500528>
- Rao, P., & Pattabiraman, T. N. (1989). Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Analytical Biochemistry*, 181(1), 18–22. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90387-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90387-4)
- Rao, P. V. S., Mantri, V. A., & Ganesan, K. (2007). Mineral composition of edible seaweed *Porphyra vietnamensis*. *Food Chemistry*, 102(1), 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.009>
- Raposo, M., De Morais, R., & Bernardo de Morais, A. (2013). Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233–252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reboleira, J., Adão, P., Guerreiro, S. F. C., Dias, J. R., Ganhão, R., Mendes, S., Andrade, M., Vilarinho, F., Sanches-Silva, A., Mateus, A., Alves, N., & Bernardino, S. (2020). Poultry Shelf-Life Enhancing Potential of Nanofibers and Nanoparticles Containing *Porphyra dioica* Extracts. In *Coatings* (Vol. 10, Issue 4, p. 315). <https://doi.org/10.3390/coatings10040315>
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M., & Meyer, A. (2015). Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies. *Marine Drugs*, 13(6), 3340–3359. <https://doi.org/10.3390/md13063340>
- Robertson, R., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D., Fitzgerald, G., Ross, R., & Stanton, C. (2015). The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages. *Marine Drugs*, 13(8), 5402–5424. <https://doi.org/10.3390/md13085402>
- Rocha, A. R. do N. (2016). Purificação e caracterização dos polissacarídeos da água das salinas de Aveiro. *Universidade de Aveiro*.
- Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoïdan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.006>
- Roleda, M. Y., & Hurd, C. L. (2019). Seaweed nutrient physiology: application of concepts to aquaculture and bioremediation. *Phycologia*, 58(5), 552–562. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1622920>
- Rong, S., & Sun, Y. (2015). Degradation of TAIC by water falling film dielectric barrier discharge – Influence of radical scavengers. *Journal of Hazardous Materials*, 287, 317–324.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.003>

- Rover, M. R., & Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *104*, 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>
- Roy, S., Shankar, S., & Rhim, J. W. (2019). Melanin-mediated synthesis of silver nanoparticle and its use for the preparation of carrageenan-based antibacterial films. *Food Hydrocolloids*, *88*(July 2018), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.013>
- Roy, S., & Rhim, J.-W. (2020). Preparation of carbohydrate-based functional composite films incorporated with curcumin. *Food Hydrocolloids*, *98*(August 2019), 105302. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105302>
- Salehi, H., Rastgar, M., & Shakeri, A. (2017). Anti-fouling and high water permeable forward osmosis membrane fabricated via layer by layer assembly of chitosan/graphene oxide. *Applied Surface Science*, *413*, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.271>
- Sampath-Wiley, P., Neefus, C. D., & Jahnke, L. S. (2008). Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützting (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *361*(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.05.001>
- Sedayu, B. B., Cran, M. J., & Bigger, S. W. (2019). A Review of Property Enhancement Techniques for Carrageenan-based Films and Coatings. *Carbohydrate Polymers*, *216*(November 2018), 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.021>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, *26*(3), 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shankar, S., Reddy, J. P., Rhim, J.-W., & Kim, H.-Y. (2015). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of chitin nanofibrils reinforced carrageenan nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.010>
- Shen, M., Song, B., Zeng, G., Zhang, Y., Huang, W., Wen, X., & Tang, W. (2020). Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution*, *263*, 114469. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469>
- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., & Rema, P. (2015). Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, *27*(4), 1671–1680. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0453-9>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In L. Packer (Ed.), *Methods in Enzymology: Oxidants and Antioxidants, Part A* (1st ed., Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press.
- Smith, J., Summers, G., & Wong, R. (2010). Nutrient and heavy metal content of edible seaweeds in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *38*(1), 19–28. <https://doi.org/10.1080/01140671003619290>
- Sutherland, J. E., Lindstrom, S. C., Nelson, W. A., Brodie, J., Lynch, M. D. J., Hwang, M. S., Choi, H.-G., Miyata, M., Kikuchi, N., Oliveira, M. C., Farr, T., Neefus, C., Mols-Mortensen, A., Milstein, D., & Müller, K. M. (2011). A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, *47*(5), 1131–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01052.x>
- Taboada, C., Millan, R., & Miguez, I. (2013). Evaluation of marine algae *Undaria pinnatifida* and *Porphyra purpurea* as a food supplement: composition, nutritional value and effect of intake on intestinal, hepatic and renal enzyme activities in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(8), 1863–1868. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5981>
- Tala, F., & Chow, F. (2014). Ecophysiological characteristics of *Porphyra* spp. (Bangiophyceae,

- Rhodophyta): seasonal and latitudinal variations in northern-central Chile. *Journal of Applied Phycology*, 26(5), 2159–2171. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0249-y>
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., & Arad, S. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 17(3), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0679-7>
- UNEP (2014). *Valuing Plastic-The Business Case for Measuring, Managing and Disclosing Plastic Use in the Consumer Goods Industry*.
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
- Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010>
- Varela-Álvarez, E., Tobin, P. R., Guihéneuf, F., FitzGerald, R. J., & Stengel, D. B. (2019). Phycobiliproteins, nitrogenous compounds and fatty acid contents in field-collected and cultured gametophytes of *Porphyra dioica*, a red sea vegetable. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3849–3860. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01841-6>
- Venkatraman, K. L., & Mehta, A. (2019). Health Benefits and Pharmacological Effects of *Porphyra* Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 10–17. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0707-9>
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., & Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs*, 9(12), 2514–2525. <https://doi.org/10.3390/md9122514>
- Víctor-Ortega, M. D., Ochando-Pulido, J. M., & Martínez-Férez, A. (2016). Phenols removal from industrial effluents through novel polymeric resins: Kinetics and equilibrium studies. *Separation and Purification Technology*, 160, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.023>
- Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M. D. C., Nilsen-Nygaard, J., Pettersen, M. K., & Freire, C. S. R. (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 80(August), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds. In *Bioactive Compounds* (pp. 33–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Wan, A., Xu, Q., Sun, Y., & Li, H. (2013). Antioxidant Activity of High Molecular Weight Chitosan and N,O-Quaternized Chitosans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6921–6928. <https://doi.org/10.1021/jf402242e>
- Wang, H., Qian, J., & Ding, F. (2018). Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(2), 395–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04528>
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., & Li, Z. (2008). Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.003>
- Wang, Liming, Liu, Y., Zhang, Z., Wang, B., Qiu, J., Hui, D., & Wang, S. (2017). Polymer composites-based thermoelectric materials and devices. *Composites Part B: Engineering*, 122, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.04.019>
- Wang, Lizhe, Auty, M. A. E., & Kerry, J. P. (2010). Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.025>
- Wang, Y., Hwang, J., Yadav, D., Oda, T., Lee, P. C., & Jin, J. (2020). Inhibitory effect of porphyran on lipopolysaccharide-induced activation of human immune cells. *Carbohydrate Polymers*, 232(2020), 115811. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115811>
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S.-K. (2011). Biological activities and potential health benefits of

- sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
- World Economic Forum, Ellen MacArthur Foundation and McKinsey & Company. The New Plastics Economy — Rethinking the future of plastics. In Routledge. (2016, <http://www.ellenmacarthurfoundation.org/publications>)
- Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environmental Science and Technology*, 51(12), 6634–6647. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>
- Wu, D., Chang, P. R., & Ma, X. (2011). Preparation and properties of layered double hydroxide–carboxymethylcellulose sodium/glycerol plasticized starch nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.030>
- Xu, S.-Y., Huang, X., & Cheong, K.-L. (2017). Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Marine Drugs*, 15(12), 388. <https://doi.org/10.3390/md15120388>
- Yadav, M., Rai, N., & Yadav, H. S. (2017). The role of peroxidase in the enzymatic oxidation of phenolic compounds to quinones from *Luffa aegyptiaca* (gourd) fruit juice. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 10(3), 154–161. <https://doi.org/10.1080/17518253.2017.1336575>
- Yanagido, A., Ueno, M., Jiang, Z., Cho, K., Yamaguchi, K., Kim, D., & Oda, T. (2018). Increase in anti-inflammatory activities of radical-degraded porphyrans isolated from discolored nori (*Pyropia yezoensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.146>
- Yeo, B. G., Takada, H., Hosoda, J., Kondo, A., Yamashita, R., Saha, M., & Maes, T. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Hopanes in Plastic Resin Pellets as Markers of Oil Pollution via International Pellet Watch Monitoring. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(2), 196–206. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0423-8>
- Yu, X., Zhou, C., Yang, H., Huang, X., Ma, H., Qin, X., & Hu, J. (2015). Effect of ultrasonic treatment on the degradation and inhibition cancer cell lines of polysaccharides from *Porphyra yezoensis*. *Carbohydrate Polymers*, 117, 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.086>
- Yuan, H., Song, J., Zhang, W., Li, X., Li, N., & Gao, X. (2006). Antioxidant activity and cytoprotective effect of κ -carrageenan oligosaccharides and their different derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(5), 1329–1334. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.11.057>
- Zabihi, F., Xie, Y., Gao, S., & Eslamian, M. (2015). Morphology, conductivity, and wetting characteristics of PEDOT:PSS thin films deposited by spin and spray coating. *Applied Surface Science*, 338, 163–177. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.02.128>
- Zala, D. A. M., Rockenbach, S. R., Obara, M. M., Barreto, W. J., Arlawa, S., Curl, R., & Lichtig, J. (1992). Protein Measurement in Several Rat Tissues by *p*-Benzoquinone (PBQ) Method. A Comparative Study with Lowry's Method. *Analytical Letters*, 25(7), 1225–1234. <https://doi.org/10.1080/00032719208016124>
- Zaporozhets, T., & Besednova, N. (2016). Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: review. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 3126–3135. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1185444>
- Zarina, S., & Ahmad, I. (2014). Biodegradable Composite Films based on κ -carrageenan Reinforced by Cellulose Nanocrystal from Kenaf Fibers. *BioResources*, 10(1), 256–271. <https://doi.org/10.15376/biores.10.1.256-271>
- Zhang, F., Meng, F., Wang, Z. Y., & NA, W. (2017). Interpolymer complexation between copovidone and carbopol and its effect on drug release from matrix tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(2), 190–203. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1230625>
- Zhang, J., Wang, D., Jiang, X., He, L., Fu, L., Zhao, Y., Wang, Y., Mo, H., & Shen, J. (2019). Multi-structured vascular patches constructed via layer-by-layer self-assembly of heparin and chitosan for vascular tissue engineering applications. *Chemical Engineering Journal*, 370(October 2018), 1057–1067. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.270>

- Zhang, Q., Li, N., Liu, X., Zhao, Z., Li, Z., & Xu, Z. (2004). The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 339(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.09.015>
- Zhang, Q., Qi, H., Zhao, T., Deslandes, E., Ismaeli, N. M., Molloy, F., & Critchley, A. T. (2005). Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, 340(15), 2447–2450. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.08.009>
- Zhang, Q., Yu, P., Li, Z., Zhang, H., Xu, Z., & Li, P. (2003). Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*. *Journal of Applied Phycology*, 15(4), 305–310. <https://doi.org/10.1023/A:1025137728525>
- Zhang, Y.-H. P., & Lynd, L. R. (2005). Determination of the Number-Average Degree of Polymerization of Cellodextrins and Cellulose with Application to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules*, 6(3), 1510–1515. <https://doi.org/10.1021/bm049235j>
- Zhang, Y., Chang, Y., Shen, J., & Xue, C. (2019). Expression and Characterization of a Novel β -Porphyranase from Marine Bacterium *Wenyinzhuangia fucanilytica*: A Biotechnological Tool for Degrading Porphyran [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9307–9313. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02941>
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, J., Zhang, H., Niu, X., & Li, P. (2009). Preparation of the different derivatives of the low-molecular-weight porphyran from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant activities in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.009>
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, J., Song, H., Zhang, H., & Niu, X. (2010a). Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyran from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.004>
- Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., & Zhang, Q. (2010b). Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.031>
- Zhang, Z., Wang, X., Su, H., Pan, Y., Han, J., Zhang, T., & Mao, G. (2018). Effect of sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* on H₂O₂-induced premature senescence in WI-38 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1235–1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.123>
- Zhao, T., Zhang, Q., Qi, H., Zhang, H., Niu, X., Xu, Z., & Li, Z. (2006). Degradation of porphyran from *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrans with different molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.12.018>
- Zhao, T., Zhang, Q., Qi, H., Liu, X., & Li, Z. (2008). Extension of life span and improvement of vitality of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with different molecular weight polysaccharides from *Porphyra haitanensis*. *Pharmacological Research*, 57(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.12.001>
- Zhou, C., Yu, X., Zhang, Y., He, R., & Ma, H. (2012). Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2046–2051. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.026>
- Zhu, Q., Chen, J., Li, Q., Wang, T., & Li, H. (2016). Antitumor activity of polysaccharide from *Laminaria japonica* on mice bearing H22 liver cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 156–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.090>

Anexos

Tabela A 1 – Composição das soluções filmogénicas preliminares pelos componentes porfirano semi-refinado extraído pelo método 2 (PorfP2), carboximetilcelulose de sódio (CMC), pectina (PcT), alginato de sódio (AL), glicerol (Gli) e cloreto de cálcio (CaCl₂). *Filmes selecionados para os ensaios de bioatividades, presentes na Tabela 2.1.

	Porf P2 (% m/v)	CMC (% m/v)	Pectina (% m/v)	AL (% m/v)	Glicerol (μ L/mL)	CaCl ₂ (% m/v)
PorfP2_0.5	0,5	0	0	0	0	0
PorfP2_1*	1	0	0	0	0	0
PorfP2_1.5	1,5	0	0	0	0	0
PorfP2_2	2	0	0	0	0	0
PorfP2_2.5	2,5	0	0	0	0	0
PorfP2_3	3	0	0	0	0	0
PorfP2_0.5_GliC	0,5	0	0	0	1,2	0
PorfP2_1_GliC*	1	0	0	0	1,2	0
PorfP2_1.5_GliC	1,5	0	0	0	1,2	0
PorfP2_GliA	1	0	0	0	1,8	0
PorfP2_GliB	1	0	0	0	1,6	0
PorfP2_GliC	1	0	0	0	1,2	0
PorfP2_1_Ca_0.05	1	0	0	0	0	0,05
PorfP2_1_Ca_0.05_GliC	1	0	0	0	1,2	0,05
PorfP2_1_Ca_0.13	1	0	0	0	0	0,13
PorfP2_1_Ca_0.13_GliC	1	0	0	0	1,2	0,13
PorfP2_1_CMC_1*	1	1	0	0	0	0
PorfP2_1_CMC_1_GliC*	1	1	0	0	1,2	0
PorfP2_0.5_CMC_0.5	0,5	0,5	0	0	0	0
PorfP2_0.5_CMC_0.5_GliC	0,5	0,5	0	0	1,2	0
PorfP2_1_CMC_0.5	1	0,5	0	0	0	0
PorfP2_1_CMC_0.5_GliC	1	0,5	0	0	1,2	0

PorfP2_1_PcT_1*	1	0	1	0	0	0
PorfP2_1_PcT_1_GliC*	1	0	1	0	1,2	0
PorfP2_0.5_PcT_0.5	0,5	0	0,5	0	0	0
PorfP2_0.5_PcT_0.5_GliC	0,5	0	0,5	0	1,2	0
PorfP2_1_PcT_0.5	1	0	0,5	0	0	0
PorfP2_1_PcT_0.5_GliC	1	0	0,5	0	1,2	0
PorfP2_1_PcT_2	1	0	2	0	0	0
PorfP2_1_PcT_2_GliC	1	0	2	0	1,2	0
PorfP2_1_AL_1	1	0	0	1	0	0
PorfP2_1_AL_1_GliC	1	0	0	1	1,2	0
PorfP2_1_AL_0.5	1	0	0	0,5	0	0
PorfP2_1_AL_0.5_GliC	1	0	0	0,5	1,2	0
PorfP2_0.5_AL_1	0,5	0	0	1	0	0
PorfP2_0.5_AL_1_GliC	0,5	0	0	1	1,2	0
PorfP2_0.5_AL_0.5*	0,5	0	0	0,5	0	0
PorfP2_0.5_AL_0.5_GliC*	0,5	0	0	0,5	1,2	0

Tabela A 2 – Composição bioquímica e bioatividades dos extratos PorfP2S1, PorfP2S2, PorfP2S4, dos restantes componentes, pectina alimentar (PcT), carboximetilcelulose de sódio (CMC), alginato de sódio (AL) e glicerol 86-88% (Gli), e dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL) e porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), e rendimento das amostras de PorfP2S1, PorfP2S2, PorfP2S4, PorfP2S5, PorfP2S6, PorfP2S7 e PorfP2S8 considerando as frações 7h1F e 7h2F.

	[Proteínas] (%)	[D-Galactose] (%)	Fenóis Totais (Eq. de ácido gálico $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de Extrato)	HPSA (ΔAbs a 524nm)		DPPH (%Inibição)		FRAP (Eq. de ácido ascórbico $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de Extrato)	ABTS (%Inibição)
				10 min	15 min	Metanol	Acetonitrilo		
PorfP2S1	*ND	67,08±4,83	0,601±0,035	0,066±0,002	0,072±0,002	2,21±1,31	10,84±1,07	0,408±0,018	20,46±0,66
PorfP2S2	*ND	67,72±4,42	0,598±0,008	0,067±0,002	0,072±0,003	2,78±0,49	8,84±1,56	0,436±0,008	20,16±0,32
PorfP2S4	*ND	68,64±4,48	0,648±0,010	0,066±0,004	0,074±0,004	1,70±0,80	11,42±1,72	0,415±0,011	21,14±0,37
PorfP2	*ND	67,74±4,13	0,616±0,027	0,066±0,002	0,072±0,003	2,23±0,78	10,36±1,36	0,420±0,014	20,46±0,90
PcT				0,019±0,002	0,033±0,002	1,140±0,28	1,72±0,91	-0,009±0,015	2,67±0,76
CMC				0,108±0,009	0,155±0,004	1,30±1,71	1,59±0,90	0,016±0,011	2,20±0,44
AL				0,113±0,006	0,134±0,002	1,95±0,69		0,038±0,007	-0,80±0,44
Gli				0,028±0,001	0,050±0,008	1,22±0,48	1,30±2,08	-0,010±0,005	2,76±0,39
PorfP2_PcT				0,017±0,002	0,031±0,002	-0,25±0,66	1,26±0,67	0,207±0,028	7,51±1,31
PorfP2_PcT_Gli				0,028±0,001	0,050±0,003	-0,02±0,71	1,64±0,72	0,168±0,049	6,62±0,41
PorfP2_CMC				0,090±0,001	0,129±0,005	0,44±0,18	1,68±1,21	0,266±0,008	10,02±0,49
PorfP2_CMC_Gli				0,089±0,001	0,123±0,018	0,21±0,42	0,92±0,73	0,180±0,016	7,09±0,84
PorfP2_AL				0,095±0,011	0,128±0,018	-0,41±0,41		0,106±0,014	6,84±1,54
PorfP2_AL_Gli				0,094±0,006	0,125±0,009	-0,76±0,62		0,113±0,010	5,36±0,52
	PorfP2S1	PorfP2S2	PorfP2S4	PorfP2S5	PorfP2S6	PorfP2S7	PorfP2S8	PorfP2	
Rendimento (%)	26,35	26,92	26,62	27,00	26,87	26,38	26,48	26,66±0,27	

*ND – Não Detetado.

Os valores representam a média ± erro padrão da média de três ensaios independentes realizadas em triplicado ou quadruplicados.

Tabela A 3 – Número de respostas corretas na diferenciação através de análise sensorial de bolas de cereais com chocolate embalados nos filmes de porfirano semi-refinado, pectina alimentar industrial e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e em polipropileno (controlo).

Provador	PorfP2_PcT_Gli	PorfP2_PcT_Gli	PorfP2_CMC_Gli	PorfP2_PcT_Gli	PorfP2_CMC_Gli	PorfP2_AL_Gli
	vs. PorfP2_CMC_Gli	vs. PorfP2_AL_Gli	vs. PorfP2_AL_Gli	vs. Controlo	vs. Controlo	vs. Controlo
	Nº de respostas corretas em 6			Nº de respostas corretas em 3		
1	1	3	2	2	1	1
2	1	3	2	1	2	0
3	2	2	3	1	1	1
4	1	1	3	2	2	1
5	2	2	0	1	1	1
6	3	3	2	1	0	0
7	1	2	2	1	0	0
8	3	2	1	1	2	2
9	1	1	2	1	1	1
10	1	2	1	1	2	2
11	2	0	3	1	1	1
12	2	3	3	0	1	2
Soma	20	24	24	13	14	12
*Nº crítico de respostas corretas	Para 72 Provas: 32			Para 36 Provas: 18		

*Segundo a Tabela T8 em Meilgaard et al. (1999)

Teste Triangular das Embalagens PorfP2 		
Nome		Data
Amostra		
Instruções Prove as amostras da sua esquerda para a sua direita. Duas são idênticas; determine a amostra diferente. Caso não consiga identificar diferenças tente adivinhar qual a amostra diferente.		
Conjuntos de três amostras _____ _____ _____ _____ _____ _____	Qual a amostra diferente? (A ou B) _____ _____	Comentários _____ _____ _____

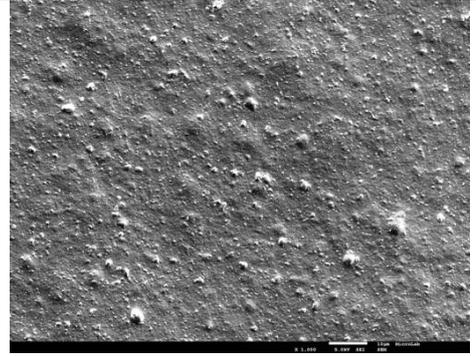
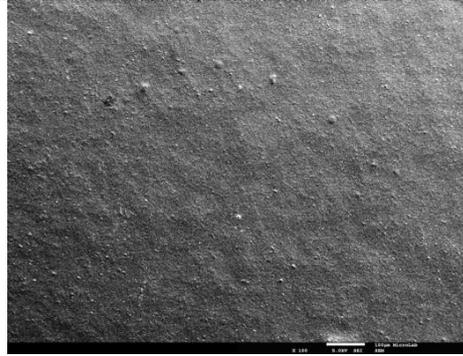
Teste Triangular das Embalagens PorfP2 		
Nome		Data
Amostra		
Instruções Prove as amostras da sua esquerda para a sua direita. Duas são idênticas; determine a amostra diferente. Caso não consiga identificar diferenças tente adivinhar qual a amostra diferente.		
Conjuntos de três amostras _____ _____ _____	Qual a amostra diferente? (C ou X) _____ _____	Comentários _____ _____ _____

Figura A 1 – Boletins de respostas das provas sensoriais por ensaio triangular das bolas de cereais com chocolate embalados nas embalagens formadas pelos filmes PorfP2_PcT_Gli; PorfP2_CMC_Gli e PorfP2_AL_Gl.

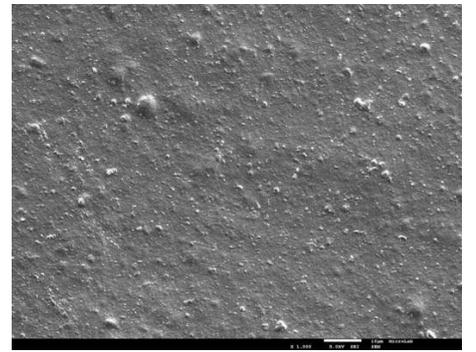
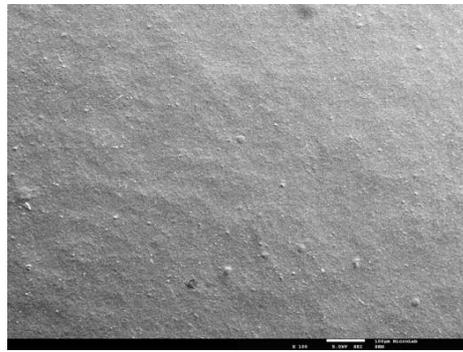
100x

1000x

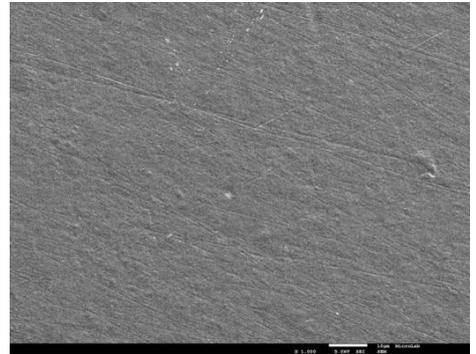
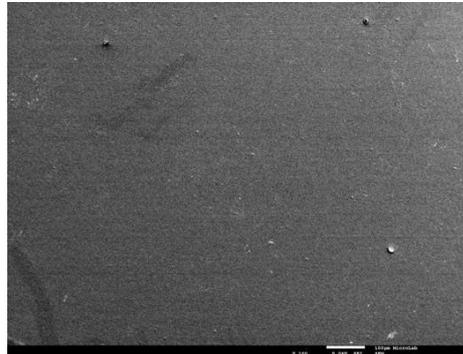
PorfP2_PcT



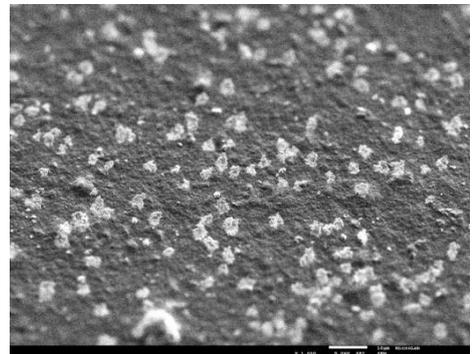
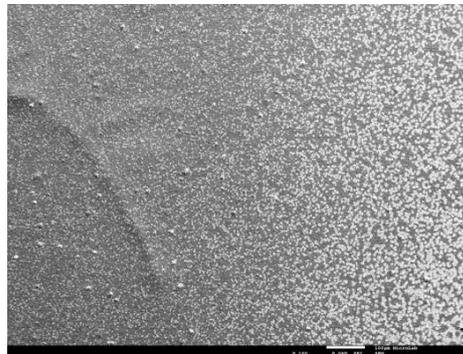
PorfP2_PcT_Gli



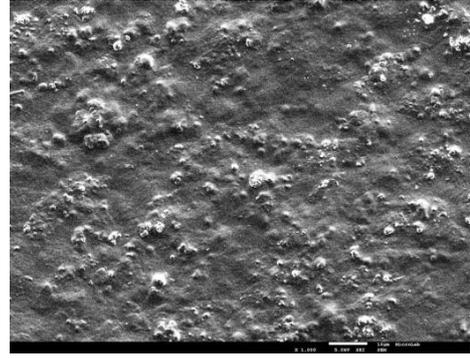
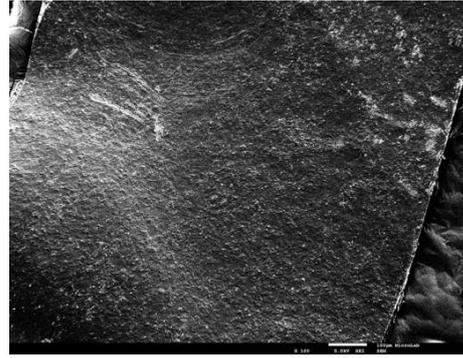
Porf_CMC



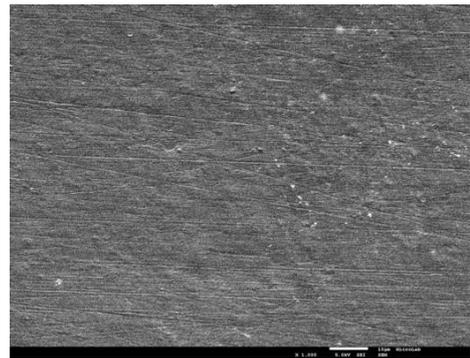
PorfP2_CMC_Gli



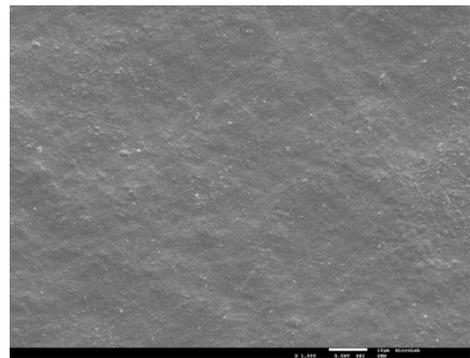
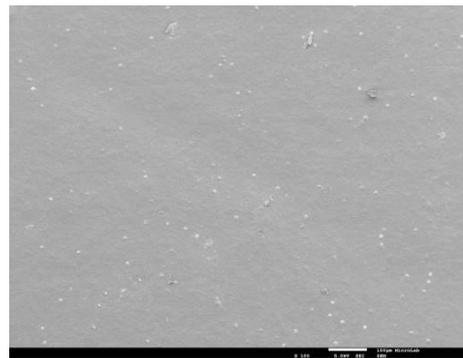
PorfP2_AL



PorfP2_AL_Gli



PorfP2



PorfP2_Gli

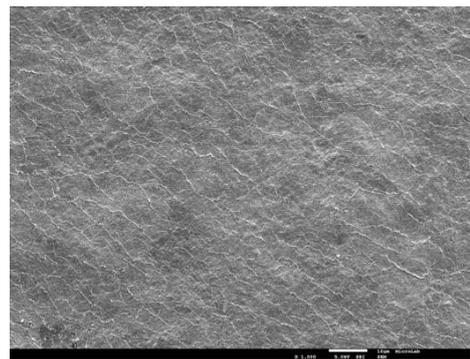
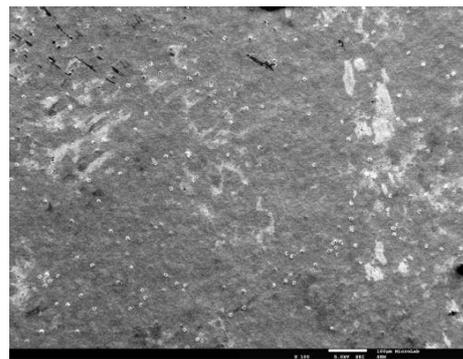


Figura A 2 – Imagens da estrutura dos filmes de porfirano semi-refinado e pectina (PorfP2_PcT), porfirano semi-refinado, pectina e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado e carboximetilcelulose de sódio (PorfP2_CMC), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli), porfirano semi-refinado e alginato de sódio (PorfP2_AL) e porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_AL_Gli) a partir de microscopia eletrônica de varrimento por emissão de campo com ampliação de 100 e 1000 vezes.

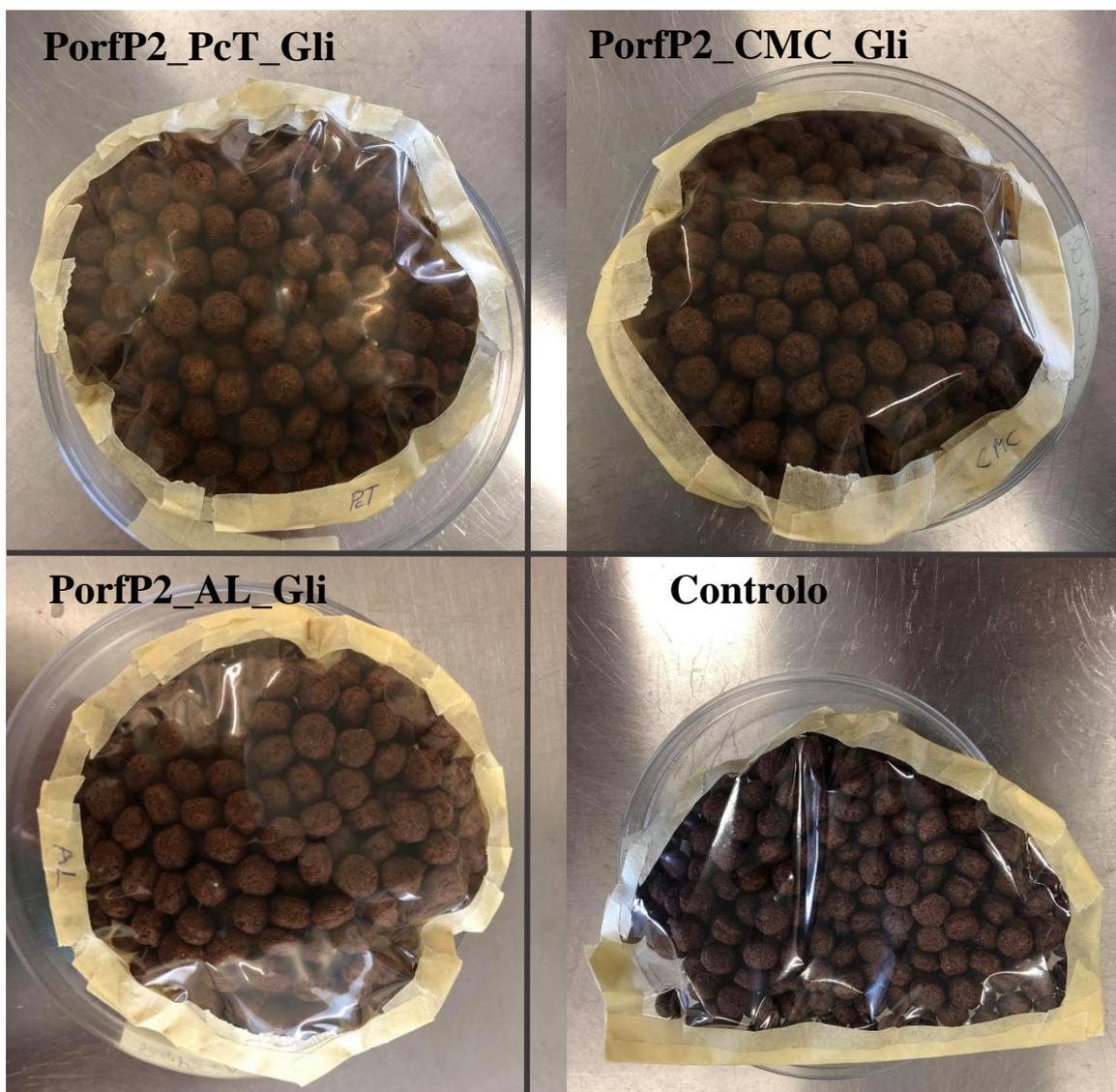


Figura A 3 – Cereais com chocolate embalados em embalagem produzidas a partir dos filmes de porfirano semi-refinado, pectina e glicerol 86-88% (PorfP2_PcT_Gli), porfirano semi-refinado, carboximetilcelulose de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_CMC_Gli) e porfirano semi-refinado, alginato de sódio e glicerol 86-88% (PorfP2_AL_Gli) e em polietileno (Controlo).