



Desenvolvimento de produtos alimentares com algas edíveis da costa de Peniche (Portugal): Chá de algas com elevado poder antioxidante

João Luís Gaspar de Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Professor Doutor, Rui Filipe Pinto Pedrosa e co-orientação da Professora Doutora, Maria Manuel Gil Figueiredo Leitão da Silva

2014

Título: Desenvolvimento de produtos alimentares com algas edíveis da costa de Peniche (Portugal): Chá de algas com elevado poder antioxidante.

Copyright © João Luís Gaspar de Oliveira
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2014

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

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Professor Doutor Rui Filipe Pereira Pedrosa e à minha Orientadora Professora Doutora Maria Manuel Gil Figueiredo Leitão da Silva, um agradecimento muito sentido pelos ensinamentos que me facultaram no âmbito da realização deste trabalho propriamente dito, como também pelos ensinamentos transmitidos no domínio do trabalho genérico. Pelo incansável empenho, pela exigência, e principalmente pela inqualificável disponibilidade para me ajudar ao longo da realização deste trabalho.

À minha Mãe, Leonor Maria da Silva Gaspar, não só pelo apoio, mas principalmente por toda a força que me transmitiu para chegar até aqui.

Aos meus familiares, com especial dedicatória para os meus Avós, Irmã e Madrinha, cujo apoio incondicional fez a diferença.

Aos meus colegas de laboratório que me apoiaram e ensinaram no que necessitei ao longo do tempo em especial ao André Horta.

Aos meus Amigos da minha aldeia, Alburitel, por toda a ajuda, direta ou indireta, pelo convívio, e por tudo o que representam.

Por último, mas não menos importante, aos Amigos de Peniche, por toda esta vivência durante estes cinco fantásticos anos.

Resumo

O chá é a bebida mais consumida no mundo depois da água, no entanto, é no continente Asiático que é mais consumido. Existem vários tipos diferentes de chá “descendentes” da planta *Camellia sinensis*. É uma bebida multifacetada e benéfica para o próprio consumidor, devido às suas propriedades organoléticas e propriedades benéficas para a saúde (presença de antioxidantes). Hoje em dia existe uma crescente procura por produtos inovadores, de elevada qualidade nutricional, nomeadamente produtos alimentares com propriedades diuréticas ou dietéticas.

Por outro lado, os organismos marinhos têm-se revelado como fonte de compostos bioativos com elevado potencial. Nomeadamente as algas que têm demonstrado produzir moléculas, pelo seu metabolismo secundário, com aplicação alimentar, farmacológica, entre outras.

Desta forma, o principal objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade da alga *Fucus Spiralis*, uma alga edível com elevado poder antioxidante, na transferência de antioxidantes durante a preparação de uma tisana, para o desenvolvimento de uma bebida inovadora “chá de alga”. Por outro lado, este trabalho teve também como objetivo fazer uma nova tisana “variante” do chá verde alga *Fucus Spiralis*.

De modo a estudar o melhor processo para a secagem da alga, esta foi seca através de três métodos: liofilização, em estufa e no secador *Tray-drier*. Para os três métodos foram avaliados vários parâmetros químicos, como a quantificação de polifenóis totais, cor, aW e teor de humidade. As análises foram realizadas logo após a secagem. Ao longo do tempo (60 dias), foi também medido a quantificação de polifenóis com a alga embalada a vácuo e sem estar embalada a vácuo. Finalmente, adicionando a alga, o chá verde e aditivos alimentares, procederam-se a três diferentes processos de conservação: esterilização, pasteurização e filtração (filtro 0,22µm). Após estes tratamentos foi realizado um estudo microbiológico, a variação de cor e a quantificação de polifenóis totais ao longo de 30 dias.

O menor valor obtido de aW foi observado para a alga liofilizada. Por outro lado os menores valores de humidade foram obtidos pela secagem por liofilização e pela utilização da estufa ventilada. A realização da tisana de *Fucus spiralis* revelou a libertação de antioxidantes em todos os processos de secagem e para todas as concentrações testadas (0,1g; 0,5g e 1g/300mL). No entanto, a libertação de polifenóis revelou-se apenas dependente do processo de secagem para a concentração de 0,5 g/300 mL, onde a quantificação total de polifenóis foi superior para o processo de liofilização (0,246 ± 0,049 mg equivalentes de ácido gálico/mL). Este valor não apresentou diferenças estatisticamente significativas com os polifenóis quantificados para a concentração de 1g/300mL. O armazenamento da alga *Fucus spiralis* ao longo de 60 dias em vácuo ou na ausência de vácuo não provocaram alterações na

quantificação total de polifenóis e foi independente do processo de secagem. Durante os 60 dias ocorreu uma diminuição dependente do tempo dos polifenóis libertados para a tisana de alga. Esta diminuição foi particularmente acentuada até aos 15 dias.

A formulação de uma tisana com 0,5g da alga *Fucus spiralis* e 0,5g de chá verde revelou-se, tendencialmente, com maior concentração de polifenóis de que uma tisana com 1 g de chá verde ou 1 g. Para a tisana com 0,5g da alga *Fucus spiralis* e 0,5g de chá verde o processo de esterilização e pasteurização não impediram o crescimento de microrganismo ao final de 30 dias de armazenamento da tisana. Contrariamente, o processo de filtração garantiu ausência de carga bacteriana durante os 30 dias de armazenamento. Por outro lado os níveis de polifenóis diminuiram ligeiramente ao longo do tempo de armazenamento, mas de um modo independente do processo de conservação.

Desta forma, as tisanas de alga (*Fucus spiralis*) e chá verde desenvolvidas no presente trabalho, quando liofilizadas e filtradas, apresentaram um elevado potencial antioxidante, apresentando-se como um produto inovador para a indústria alimentar.

Palavras-chave: Algas castanhas; Antioxidantes; Chá; Processos térmicos; Secagem.

Abstract

Tea is the most consumed beverage in the world after water and it is most consumed on the Asian continent. There are several different types of tea, descendants of the plant *Camellia sinensis*. It is multifaceted and beneficial drink for the consumer himself due to its organoleptic properties and beneficial properties for health (presence of antioxidants). Today there is a growing interest for innovation, high quality nutritional products with highlight applications for dietetics or diuretic.

Marine organisms have been one of the main sources of bioactive compounds with high potential. Specifically, algae have been linked to the production of secondary metabolism molecules with application in food science, pharmacology, among others.

Therefore, the main objective of this project was to evaluate the ability of the algae *Fucus Spiralis*, an edible alga with high antioxidant power to transfer antioxidants during preparation of an infusion to develop a novel drink "Algae-tea". Moreover, this project also aimed to make an optimization of a new drink green tea based adding the alga *Fucus Spiralis*.

In order to study the best procedure for drying the algae, it was dried by three methods: freeze drying, in kiln and finally, the tray-drier. For these three methods it was evaluated numerous chemical parameters, like the quantification of total polyphenol contents, colour, aW and moisture content analyses were conducted after drying. Over time (60 days) was also measured the polyphenol contents in the presence or in the absence of vacuum packaging. Finally, the infusion of alga, green tea and the food additives was processed by sterilization, pasteurization and also the filtration (filter 0,22µm). After these treatments a microbiological study, changes in color, and quantification of total polyphenols over 30 days was carried out.

The lowest aW value was obtained for the freeze dry alga. On the other hand the low moisture was obtained for both in kiln and freeze dry processes. The *Fucus spiralis* infusion resulted in the extraction of antioxidants in all the three dry methods used for all the alga concentration tested (0.1, 0.5 and 1g/300mL). However, the polyphenol quantification only was dry process dependent for the concentration of 0.5g/300mL with high values for the freeze dry process (0.246 ± 0.049 mg of acid gallic equivalents/mL). Moreover, this polyphenol concentration was similar to those obtained for the high alga concentration tested (1g/300mL).

The storage of dry *Fucus spiralis* during 60 day in the presence or in the absence of vacuum did not change the polyphenol contents and was dry process independent. During the 60 days it was observed a time dependent decrease of the polyphenol contents. However, the main drop occurred in the first 15 days.

The new infusion of 0.5g *Fucus spiralis* and 0.5g green tea revealed, tendentially, high polyphenol contents when compared with the 1g *Fucus spiralis* or 1g green tea

infusion. It was observed high microorganism growth after 30 day of store for the new infusion of 0.5g *Fucus spiralis* and 0.5g green tea treated by pasteurization or sterilization processes. By contrast, the filtration process blunt the microorganism growth during the 30 days of storage. On the other hand, the polyphenol contents slightly drop during the 30 day of storage in a conservation independent manner.

The filtered infusions of the freeze dry alga (*Fucus spiralis*) and green tea developed in this study showed a high antioxidant potential, presenting itself as an innovative product for the food industry.

Keywords: Brown algae; Antioxidants; Tea; Thermal processes; Drying.

Índice

	Página
<i>Resumo</i>	ix
<i>Abstract</i>	xiii
1. <i>Introdução</i>	3
1.1 <i>O chá</i>	3
1.1.1 <i>Camellia sinensis</i>	3
1.1.2 <i>Aos diferentes tipos de chá</i>	4
1.2 <i>Chá aromático e chá engarrafado</i>	5
1.3 <i>Chá verde e saúde</i>	5
1.3.1 <i>Chá e ingestão alimentar</i>	7
1.4 <i>Algas na “nova” alimentação</i>	7
1.4.1 <i>Algas castanhas</i>	8
1.4.2 <i>A alga Fucus Spiralis</i>	9
1.5 <i>Inovação na indústria alimentar</i>	10
1.5.1 <i>Algas castanhas</i>	12
1.5.2 <i>A alga Fucus Spiralis</i>	12
1.6 <i>Secagem e preservação de alimentos</i>	13
1.7 <i>Conservação de alimentos</i>	14
1.8 <i>Aditivos alimentares</i>	15
1.8.1 <i>Os edulcorantes</i>	15
1.8.2 <i>A alga Fucus Spiralis</i>	16
2. <i>Enquadramento, objectivo e desenho experimental</i>	21
2.1 <i>Enquadramento</i>	21
2.2 <i>Objetivo</i>	21
2.3 <i>Desenho experimental</i>	22
3. <i>Material e Métodos</i>	27
3.1 <i>Equipamentos</i>	27
3.2 <i>Recolha das amostras</i>	28
3.3 <i>Processos de secagem</i>	28
3.4 <i>Preparação das amostras</i>	28

3.5 Aditivos alimentares	29
3.6 Preparação do chá de algas	29
3.7 Estudos de caracterização do chá de algas	30
3.7.1 Humidade	30
3.7.2 aW	30
3.7.3 Avaliação instrumental da cor	30
3.7.4 Polifenóis Totais	31
3.7.5 Provas sensoriais	31
3.7.6 Processos de conservação	32
3.7.7 Microbiologia	32
3.8 Produto final: chá de algas + chá verde	34
3.9 Análise estatística	34
4. Resultados	39
4.1 Secagem	39
4.1.1 Secador Tray-drier	39
4.1.2 Estufa ventilada	39
4.1.3 Liofilizador	39
4.2 Caracterização da alga <i>Fucus spiralis</i>	39
4.2.1 aW	39
4.2.2 Humidade	40
4.3 Capacidade antioxidante das tisanas da alga <i>Fucus spiralis</i>	42
4.3.1 Quantificação total de polifenóis (QTP)	42
4.4 Embalagem da alga a vácuo	43
4.4.1 Quantificação total de polifenóis (QTP) com embalagem a vácuo e sem embalar a vácuo	43
4.5 Tisana de <i>Fucus spiralis</i> com chá verde	46
4.6 Provas sensoriais realizadas	47
4.7 Produto final – Processos de conservação	48
4.7.1 Microbiologia	48
4.7.2 Polifenóis	50

4.7.3 <i>Cor</i>	51
5. <i>Discussão</i>	59
6. <i>Conclusões e Perspetivas futuras</i>	67
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	73

Introdução

1.1- O chá

O chá é uma bebida amplamente conhecida em todo o mundo. A seguir à água, é a bebida mais consumida no mundo, apesar de no mundo asiático ser muito mais popular do que na Europa (Awasom, 2011). É uma bebida multifacetada, pois pode ser servida quente, fria ou até mesmo gelada. Por cada ano são produzidos cerca de três bilhões de toneladas de chá, sendo que 78% corresponde a chá preto, 20% a chá verde e apenas 2% ao restante tipo de chá (Lima & Mazzafera, 2009).

O crescimento do chá é impulsionado pela crescente consciência para a saúde entre os consumidores. Estudos nos EUA, Reino Unido e Japão indicam que determinados chás contêm antioxidantes, que ajudam a prevenir o cancro, doenças cardíacas e doenças neurológicas (Jombart & Kim, 2013). Para além disso, o chá é considerado um relaxante para o ritmo de vida acelerado como o actual. O desenvolvimento de novas formulações de chá estão cada vez mais inovadores e criativas existindo uma grande abundância de novos produtos.

As maiorias dos países desenvolvidos deparam-se com um elevado envelhecimento da população, o que torna as populações mais preocupadas com as questões de saúde, estando cada vez mais conscientes do bem-estar em geral. Por todas estas razões verifica-se uma mudança no consumo de refrigerantes e café, para o consumo de chá (Ghosh, Misra, Bhattacharya, & Trivedi, 2012).

Cada vez mais os consumidores procuram produtos relacionados com a cultura e tradições antigas. Há também um desejo, de garantir que as bebidas são cada vez mais limpas e saudáveis, o que acelerou o movimento para substituir bebidas à base de açúcar, por bebidas mais tradicionais e naturais (Lloret & Schmalko, 2012).

Não restam dúvidas de que o chá vai-se tornar um estilo de vida para muitos, já que para alguns, se tornou um ritual, pois é conhecida por ter uma rica história sociocultural (Awasom, 2011)

1.1.1- *Camellia sinensis*

A *Camellia sinensis* é uma das principais plantas utilizadas atualmente no desenvolvimento de chás, e pertence à família *Theaceae*, género *Camelli* e espécie *Sinensis* (Albuquerque, A. P. 2014).

Camellia sinensis é a planta base do chá verde, do chá preto e do chá Oolong. A única e grande diferença é o grau de fermentação que a planta sofre no final do processo de preparação. Isto é, a planta que é fermentada é o chá preto, o que não é fermentado é o chá verde e o Oolong é um chá semi-fermentado (Lima & Mazzafera, 2009). Os chás produzidos a partir de infusões da planta *Camellia sinensis* movimentam milhões e

milhões de euros anualmente, por possuírem propriedades medicinais bastante conhecidas e serem considerados alimentos funcionais (Khan & Mukhtar, 2011).

Esta mesma planta é oriunda do mundo ocidental, mais propriamente da China, e tem sido cultivada desde os tempos pré-históricos (Taylor & Francis, 2011). Inicialmente utilizou-se como um vegetal e, posteriormente começou a ser utilizada como fonte de uma bebida com inúmeras qualidades benéficas. Atualmente já existem plantações em diversos países, como no Brasil, ou na Argentina. Em Portugal existem algumas plantações no Arquipélago dos Açores, mais propriamente na Ilha de São Miguel, considerada a plantação mais antiga da Europa.

Os constituintes mais importantes das folhas do chá de *Camelia sinensis* são compostos fenólicos, em especial taninas, que são polímeros de polifenóis, como o ácido gálico e flavenóides como a quercetina, miricetina, canferol e catequinas (Tsai & Hsu, 2013). As catequinas são polifenóis responsáveis pela cor e corpo do chá, correspondentes a 26,7% dos compostos presentes na espécie *Camelia Sinensis* (Morais, Cavalcanti, Costa, Aguiar & Costa, 2009).

1.1.2- Os Diferentes tipos de chá

Hoje em dia, existe uma enorme diversidade de marcas de chá, bem como a uma existência de inúmeros chás diferentes. Tal facto é devido às misturas eficientes dos mesmos. À semelhança do tabaco e do café, também existem misturas de chás. Uma mistura bem pensada e organizada de tipos diferentes de chás poderá assegurar uma confiável experiência de sabor. Consoante o objetivo, o tipo de chá a consumir deverá ser diferente, pois cada chá tem o seu próprio benefício.

É através da planta *Camellia sinenses* que se obtém os chás mais consumidos no mundo inteiro, nomeadamente o chá preto, o verde, o Oolong (Nishiyama & Costa, 2010).

O Chá Preto algumas vezes referido como o Chá Inglês, é o chá que passa por um maior processo, que inclui a oxidação e por isso é considerado um chá fermentado. Este processo faz com que a tonalidade das folhas fique avermelhada escura e com um cheiro doce. O Darjeeling, English Breakfast e Assam, são alguns dos chás pretos mais conhecidos.

Para o desenvolvimento do chá Verde as folhas são recém-colhidas e cozinhadas imediatamente no vapor para prevenir a oxidação. Assim sendo, é um chá não-fermentado e o seu processo permite que as folhas fiquem verdes. Tem um sabor delicado e um cheiro característico.

Chá Oolong é um chá pouco conhecido para a população Portuguesa, pois é principalmente produzido na China. Para a sua preparação as folhas são secas diretamente sob a luz solar e sacudidas em cestos de bambu. É um chá semi-fermentado, que está entre o verde e o preto, mas mais próximo do verde (Taylor & Francis, 2011).

1.2- Chá aromático e chá engarrafado

O chá aromático é criado através da mistura de aromas adicionais às próprias folhas do chá, antes de este ser empacotado. Como exemplo, o chá de jasmim é criado com a adição das flores de jasmim aos chás verdes ou chás Oolongs.

O chá engarrafado entrou repentinamente no mercado, sendo que atualmente está em boa cotação perante os consumidores. Tratou-se de uma grande inovação que consegue conciliar um ótimo sabor com as suas benéficas propriedades, sem qualquer trabalho para o consumidor final.

Existem hoje em Portugal, duas grandes marcas que comercializam este tipo de chá. São elas, a Lipton através da marca Lipton Línea e o Pleno Tisanas. Tanto as tisanas, como as infusões são bebidas preparadas com outras ervas que não a *Camellia sinenses*. Por exemplo, o tão conhecido chá de camomila é uma infusão feita com flores de camomila, e a planta *Camellia sinensis*.

Uma tisana e uma infusão são diferentes. Uma tisana acontece quando colocamos a planta num recipiente com água a ferver e depois deixamos repousar algum tempo antes de beber. A infusão é feita quando deitamos a água a ferver sobre as ervas dentro de um recipiente e deixamos repousar. O tempo de repouso difere consoante o tipo de planta. A tisana é mais forte em sabor, aroma, cor e princípios ativos do que uma simples infusão da mesma planta.

1.3- Chá verde e saúde

O chá verde é uma bebida tradicional em muitos países asiáticos. Os benefícios de saúde do chá verde foram comprovados pela ciência ao longo das últimas décadas, levando à sua promoção em todo o mundo.

A expansão do consumo de chá verde nos países ocidentais parece ser viável e essa viabilidade tem estimulado a indústria de chá, com vista ao esclarecimento, perceção e preferência em diferentes culturas dos consumidores. Como referido anteriormente, o chá verde é obtido a partir das folhas *Camellia sinensis*, para além da sua atividade antibacteriana e anticancerígena (Borrelli, Capasso, Russo, & Ernst, 2004), ajuda

também na redução do colesterol, sendo uma enorme fonte de antioxidantes (Freitas, H. C. P., & Navarro, F., 2012).

Um dos benefícios do chá verde passa pela propriedade facilitadora do emagrecimento, se usada corretamente. Tal facto constitui um dos motivos pelos quais ficou tão conhecida no Ocidente. O chá verde atua na diminuição da retenção de líquidos, estimula o funcionamento do fígado e combate a prisão de ventre (Nishiyama & Costa, 2010). No entanto a sua ingestão deve ser usado apenas como complemento alimentar (Carter & Drewnowski, 2012).

Trata-se de um antioxidante natural e o consumo destes antioxidantes, como os compostos fenólicos que estão presentes na maioria das plantas, inibem a formação de radicais livres. Os antioxidantes têm sido associados a uma menor incidência de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo (Scheibmeir & Christensen, 2005). Os antioxidantes são substâncias que possuem propriedades capazes de proteger as células do corpo dos efeitos causados por radicais livres, que são moléculas ou átomos altamente reativos que acabam por causar efeitos adversos a nível celular. O efeito dos antioxidantes evita, ou minimiza, esses danos causados pelos radicais livres e assim acabam por atuar na prevenção do envelhecimento celular, podendo mesmo ser eficientes no tratamento de algumas patologias (Lambert & Yang, 2003).

Outro dos benefícios do chá verde diz respeito às substâncias que contêm, como as taninas. Tratam-se de compostos que estão associados à diminuição dos níveis de LDL, lipoproteínas de baixa densidade, que transporta o colesterol até às células, que comumente é denominada por muitos de "mau colesterol". Esta denominação está associada à formação de placas de gordura nas paredes arteriais que, posteriormente, calcificam-se, formando as placas ateroscleróticas. Sobre tais placas formam-se coágulos sanguíneos que provocam o bloqueio dos vasos, impedindo o fluxo sanguíneo normal. Minimizando os níveis das LDL, o chá verde acaba por atuar na prevenção de doenças cardiovasculares (Thielecke & Boschmann, 2009).

Além de todos benefícios do chá verde para a saúde, na sua composição encontram-se, em quantidade razoável, algumas vitaminas e sais minerais essenciais para o ser humano, como a Vitamina B1, B2 e B9, Vitamina C, Vitamina K, Manganésio e Potássio (Harbowy & Balentine, 1997).

As mesmas taninas, substâncias referidas anteriormente, que estão associadas à diminuição de colesterol no organismo, podem causar gastrites no estômago, principalmente em doentes reincidentes. As taninas agem no sistema digestivo inteiro, podendo causar ainda problemas adicionais noutros órgãos, como por exemplo no fígado (Panel & Nda, 2011).

1.3.1- Chá e ingestão alimentar

O papel da fibra dietética na saciedade e as suas implicações para a perder peso tem sido intensamente pesquisado (Van Kleef, Van Trijp, Van Den Borne, & Zondervan, 2012).

Além da dose de fibra, há outros fatores que interferem, como por exemplo a forma como é consumida. Isto é, em alimentos integrais ou em forma de líquido pode desempenhar um papel importante na saciedade (Baldissera, A. C. 2011). . Alguns estudos demonstram que consumir a fruta inteira sacia mais do que consumir quantidades semelhantes de fibras sob a forma de sumos de fruta. Mas, estudos recentes demonstraram que a presença de fibras solúveis em bebidas pode reduzir o consumo de energia durante uma refeição (Mattar, H., 2004).

Para além da fibra, os constituintes do chá verde podem contribuir para a saciedade (Ledesma, 2009). Apesar de ter havido apenas alguns estudos realizados em seres humanos sobre o efeito que epigallocatequina galato (EGCG) ou da cafeína, duas substâncias existentes no chá verde, na fome ou saciedade, os pontos de investigação existentes apontam para um efeito saciante de ambos. Quando a EGCG foi administrado nos participantes do estudo, em combinação com outros ingredientes bioativos, e ficou demonstrado que cria a sensação de saciedade (Reinbach, Smeets, Martinussen, Møller, & Westerterp-Plantenga, 2009). Além disso, a cafeína sozinha demonstrou diminuir apetite e também tem sido demonstrado que se trata de um supressor do apetite, em combinação com outros ingredientes naturais.

1.4- Algas na “nova” alimentação

O uso de algas como alimento remonta ao século IV no Japão e na China. Atualmente, estes dois países, juntamente com a Republica da Coreia são os maiores consumidores de algas na forma de alimento, sendo o Japão o que mais consome. Existem vários estudos recentes que dizem que esta também é a população que vive mais tempo e que é mais saudável (Morita, Niwa, & Fujimoto, 2010). Por estas razões verifica-se um aumento da procura de algas para a alimentação ao longo dos últimos cinquenta anos, um pouco por todo o mundo.

Nos últimos tempos a sociedade viu-se confrontada com transformações nas suas condições económicas, demográficas e socioculturais, bem como, o crescimento de segmentos populacionais e variação dos hábitos alimentares, levando a que, atualmente, os consumidores prefiram alimentos diferenciados, sendo essa procura motivada por fatores económicos, atitudes, preferências ou perceções (Bureau, 2010). Na área alimentar, nos últimos tempos, as algas têm vindo a ser alvo de estudos, pelo

facto de interferirem de forma benéfica nas reações oxidativas, retardando-as e aumentando a estabilidade dos óleos e gorduras.

A constituição das algas apresentam vários compostos bioativos e com um enorme potencial benéfico para a saúde. Com isso, o seu uso como ingrediente na indústria alimentar está a aumentar, o que é muitíssimo importante para a saúde do ser humano. Têm sido bastantes os estudos efetuados a vários tipos de algas, algumas já se sabe que são comestíveis, essas contêm níveis aceitáveis de proteínas e a sua composição em aminoácidos é de grande interesse nutricional. A fração lipídica das algas apresentam uma proporção elevada em ácidos gordos essenciais, particularmente em ácidos gordos polinsaturados e são também uma fonte de minerais, como cálcio, sódio, magnésio, potássio, iodo, ferro e zinco. São igualmente consideradas uma fonte de fibra alimentar, visto que os seus componentes principais são polissacarídeos não digestíveis (López-Lopez , I; Bastida, 2009). Para além de tudo o referido anteriormente, as algas possuem atividade antioxidante devido ao seu conteúdo em carotenóides, compostos fenólicos, alfa-tocoferol, flavenóides, entre outros com componentes antioxidantes (Denny e Gaines, 2007) e (Steele *et al.*, 2009). Devido a todas estas qualidades, as algas têm sido cada vez mais inseridas nas dietas da população mundial como aditivo alimentar, pois a sua elevada capacidade como antioxidante natural tem também a vantagem de prevenir a oxidação dos alimentos, preservando a sua qualidade e assim aumentando o tempo de prateleira dos mesmos (Power, Wang, Kang, Pan, & Wu, 2011). Os compostos antioxidantes das algas atuam contra uma série de doenças, apresentando potencial anti-inflamatório, antibacteriano ou antifúngico (Cornish & Garbary, 2010), (Chew *et al.*, 2008) e (Díaz-Rubio *et al.*, 2008) .

1.4.1- Algas castanhas

Muitos dos organismos marinhos, normalmente através do seu metabolismo secundário, produzem moléculas bioativas, de modo a responderem a pressões ecológicas como por exemplo a competição pelo espaço ou a defesa contra predadores, demonstrando estas moléculas atividade biológica, como atividade antimicrobiana, antifúngica, anticoagulante, antitumoral e antioxidante. A utilização dos antioxidantes como protetores dos alimentos e o seu consumo previne o organismo e os alimentos de condições oxidantes. De entre os vários organismos marinhos, podem-se destacar as algas como um dos maiores produtores de moléculas bioativas, com elevado potencial antioxidante e antimicrobiano (Lee & Jeon, 2013).

As algas, por possuírem moléculas com capacidade antioxidante, antimicrobiana, mas também com capacidade antitumoral, têm uma aplicabilidade enorme, quer na

indústria farmacêutica, quer na indústria alimentar e, obviamente, na área da restauração, enquanto alimento saudável. A suportar esta ideia alguns estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos asiáticos possuem uma baixa incidência em patologias crónicas como o cancro. Esta observação foi diretamente relacionada com o facto da dieta tradicional dos asiáticos conter uma fonte enorme de plantas comestíveis, principalmente as algas (Kwabi-Addo, 2011).

Existem milhares de variedades de algas marinhas, sendo classificadas a partir da sua coloração, podendo ser designadas algas verdes, vermelhas ou castanhas. Cada alga é única na sua forma, sabor e textura. Embora nem todas as algas marinhas existentes sejam consumidas, uma parte é já incluída na alimentação humana. As algas são alimentos riquíssimos em micronutrientes (vitaminas, minerais), mas também possuem proteínas com aminoácidos essenciais, hidratos de carbono e pouca gordura, apesar de polinsaturada do tipo ómega-3. O povo português não tem o hábito de consumir algas, contudo ingere os subprodutos das algas. No entanto, diante tantas vantagens associadas à ingestão de algas, seria muito importante que a população portuguesa introduzisse este alimento na dieta.

1.4.2- A alga *Fucus Spiralis*

A alga *Fucus spiralis* pertence ao filo Heterokontophyta (algas castanhas) e à ordem Fucales. É uma espécie comum no patamar médio litoral formando faixas nítidas nalgumas zonas rochosas costeiras, como é exemplo a costa de Peniche.

Esta alga possui talos com 10 a 50 cm de comprimento, de estrutura cartilaginosa, fixa a um substrato por um pequeno disco a partir do qual se desenvolve uma lâmina com nervura central que se divide dicotomicamente. Nas zonas apicais encontram-se os órgãos reprodutores denominados conceptáculos, que são de contorno circular, rodeados por uma estreito rebordo da fronde estéril. Esta espécie pode tolerar um alto nível de dessecação, passando 90 por cento do tempo fora de água, sendo capaz de sobreviver à perda de 70-80 por cento de água (Rodrigues, I. 2011).

A alga *Fucus Spiralis* tem um potencial antioxidante enorme, isto porque está relacionada tanto com elevado teor de polifenóis, como com a alta capacidade de eliminação de radicais (Pintéus & Alves, 2009).

No presente trabalho, a alga escolhida foi a *Fucus Spiralis*, não só por ser uma alga edível, mas também por estudos anteriores do nosso grupo de investigação demonstrou que, de todas as algas estudadas, a *Fucus spiralis* foi a alga com maior capacidade antioxidante (Pintéus, 2011). Por outro lado, o facto de existir na costa Portuguesa, incluindo em Peniche, também foi um fator importante.

1.5- Inovações na Indústria alimentar

A evolução do consumidor, no sentido de adotar uma postura mais consciente em relação aos produtos que adquire é evidente. Na área de alimentos, esta evolução foi ainda mais nítida pois, em função do conceito de qualidade de vida, cada vez mais difundido por todo o mundo, foi agregado à dieta o atributo de saúde, fundamental para manter ou promover a qualidade de vida (Balduino, 2012).

Hoje em dia, a indústria alimentar procura cada vez mais alimentos funcionais. Esta nova classe de produtos tem tido sucesso nos mercados devido à crescente procura por alimentos saudáveis (Plaza & Santoyo, 2010). Os alimentos funcionais possuem ingredientes que por si só podem conferir benefícios à saúde, para além dos aspetos nutricionais que todos os alimentos devem conter. Existe uma vasta gama de compostos que podem ser utilizados como ingredientes funcionais, tais como carotenóides ou outros pigmentos fotossintéticos, ácidos gordos, polifenóis, entre outros. Neste sentido, a procura por compostos naturais com atividades funcionais, como por exemplo, antioxidantes, faz cada vez mais sentido. Para além disto, no contexto da indústria alimentar, a pesquisa de antioxidantes de origem natural poderá ter uma aplicação muito prática na preservação dos alimentos, aumentando o tempo de vida destes. Os alimentos ricos em gorduras são normalmente alimentos com um tempo de prateleira pequeno, pois estão sujeitos a uma intensa atividade de enzimas que atuam nos lípidos, provocando a sua deterioração (Heo, Park, Lee, & Jeon, 2005). Existe também outro tipo de antioxidantes utilizados na indústria alimentar, os chamados antioxidantes sintéticos. Apesar da sua elevada capacidade antioxidante, a sua utilização tem sido muito controversa, nomeadamente por suspeita de efeitos cancerígenos, estando alguns proibidos por falta de dados toxicológicos conclusivos. O antioxidante ideal deverá ser seguro sob o ponto de vista alimentar, não alterar o sabor, o aroma ou a cor do alimento, ser eficiente a baixas concentrações e a temperaturas de fritura e cozedura, ser facilmente incorporável, de fácil obtenção e barato (Bernardo-Gil, M. G, 2001).

Neste contexto, a adição de antioxidantes resultantes de fontes naturais poderá contribuir significativamente para o aumento do tempo de vida dos alimentos (Mageid & Salama, 2009). Na realidade, a descoberta de compostos bioativos marinhos que, simultaneamente, possuam uma elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana, poderão aumentar substancialmente o tempo de vida dos alimentos podendo ser a resposta para a atual falta de compostos naturais na indústria alimentar.

Como referido anteriormente, na indústria alimentar o uso de antioxidantes e os seus mecanismos funcionais têm vindo a ser amplamente estudados ao longo dos anos. Os

antioxidantes são compostos, formados por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, compostos fenólicos e ainda enzimas, que retardam e/ou impedem as reações de oxidação pelo bloqueio dos radicais livres e pela doação de elétrons e hidrogénio. Nos alimentos, os antioxidantes são moléculas que protegem macromoléculas, neutralizando o processo de oxidação, através da proteção de lípidos e proteínas do contacto com precursores do processo oxidativo e atuando como agentes que previnem a oxidação, suspendendo a etapa de propagação da auto-oxidação, facto que acontece particularmente no processo de peroxidação lipídica em ácidos gordos polinsaturados (Lidon, 2007).

Os antioxidantes sintéticos são mais utilizados em produtos alimentares. No entanto, nas últimas décadas, o seu uso tem vindo a ser ultrapassado pelos antioxidantes naturais, visto que existem estudos que indicam um efeito de toxicidade na saúde do consumidor, com o risco acrescido de alergias, aumento dos níveis de colesterol ou a acumulação de tecidos adiposos. Por este facto, não são permitidos na produção de alimentos para crianças e bebés (Lidon, 2007).

Os antioxidantes têm a capacidade de retardar a oxidação lipídica através, não só da ligação competitiva ao oxigénio, como também através da ligação aos radicais livres, estabilizando os hidroperóxidos. Podem “sequestrar” as formas ativas do oxigénio, envolvidas nas primeiras etapas do processo de oxidação, quebrando todo o processo, formando uma ligação estável antioxidante-radical que não poderá entrar nos passos seguintes do processo de peroxidação lipídica, impedindo assim a formação de produtos indesejáveis e como tal a degradação das propriedades benéficas do produto (Basu, 1999).

Os polifenóis são antioxidantes com elevado potencial, amplamente presentes nas plantas e nas algas (Onofrejová, Kopecký, & Vacek, 2010). Os compostos fenólicos são resultado da biossíntese da hidroxicinamoil coenzima A e podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxílicos, incluindo os seus derivados funcionais.

Outra das características dos polifenóis mais complexos relaciona-se com o extensivo sistema de duplas ligações existentes que permite a absorção de luz na parte visível do espectro, ou seja possuem cor. Todas estas propriedades dos compostos fenólicos conferem-lhes propriedades moleculares funcionais únicas (Manach, Scalbert, & Morand, 2004).

Os polifenóis têm sido descritos como possuindo elevada atividade antioxidante *in vitro*, por medição da sua capacidade para aprisionar radicais livres e reduzir outros compostos, conseguindo ser mais eficazes que a vitamina C e E (Michalak, 2006).

Vários estudos em animais demonstraram que o consumo de polifenóis limita o desenvolvimento de lesões ateromatosas e pode inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), contribuindo para a prevenção de doenças cardiovasculares (Scalbert, Manach, & Morand, 2005). O maior e mais importante grupo de fenóis é o dos flavenóides (Tringali, C. 2003).

Estes compostos têm sido reconhecidos na atividade, anti-inflamatória, anti-alérgica, anti osteoporótica, anti-carcinogénica, nas doenças cardiovasculares e nas doenças neurodegenerativas. Vários estudos clarificam a ação dos flavenóides como agentes antioxidantes. O mecanismo de ação tem por base a modulação de sinal de vias intracelulares importantes para a função celular. A sua baixa toxicidade e elevada acessibilidade tem demonstrado que o seu consumo poderá ser um dos caminhos mais favoráveis para prevenir e tratar danos causados pelo *stress* oxidativo (Gomes, Fernandes & Lima, 2008).

Dentro deste grupo dos flavenóides encontramos as catequinas, que estão presentes em grande quantidade no chá verde.

1.5.1- Novas dietas

Todos os alimentos têm a sua função nutricional, fornecendo nutrientes essenciais. Conforme as culturas, são mais ou menos consumidos, pois as condições socioeconómicas, as diferentes religiões e a localização geográfica influenciam de certa forma as preferências dos consumidores (Willett & Manson, 1990). Em Portugal, como no resto da Europa do Sul e Norte de África a alimentação baseia-se na Dieta Mediterrânea. A dieta tradicional mediterrânea é caracterizada pela abundância em fruta, vegetais, cereais e legumes, sendo o azeite a principal fonte de gordura (Carrasco-Pancorbo & Gómez-Caravaca, 2006).

1.5.2- Chá verde e exercício físico

Estudos recentes defendem que, o uso do chá verde auxilia na perda de peso corporal, na perda de gordura corporal e manutenção da massa magra, porém os valores não foram muito significantes (Cardoso, 2011).

O exercício físico contribui para o aumento da massa muscular, aumento significativo da taxa metabólica de repouso, para a diminuição do perímetro abdominal, diminuição nos níveis de triglicéridos e diminuição da gordura corporal. De realçar que, esta última variável diminui em nível inferior ao que o consumo isolado de chá verde proporcionou (Nagao, T.; Hase, T & Tokimitsu, I. 2007).

O consumo de chá verde aliado ao exercício físico de resistência apresentou ser a melhor opção para a mudança significativa na composição corporal, maior diminuição

do perímetro abdominal, maior diminuição de gordura corporal, maior aumento de massa magra, maior diminuição do percentual de gordura e maior diminuição nos níveis de triglicérides na corrente sanguínea.

O chá verde proporciona ao indivíduo uma mudança na composição corporal, com diminuição da gordura e consequente perda de peso, e manutenção da massa magra. O consumo do produto a base de chá verde aliado à prática de exercício físico (musculação) auxilia em um ganho de massa magra maior que o proporcionado pelo exercício físico isolado e favorece uma maior perda de massa gorda, por mobilizar esta como fonte de energia (Mahan, L. & Escott-Stump, S. 2005).

Aliado ao treino físico de resistência, o chá verde auxilia na perda maior de gordura e maior ganho de massa magra, a médio e longo prazo favorece a perda de peso, com qualidade de vida (Cardoso, 2011).

1.6- Secagem e preservação de alimentos

A secagem das algas marinhas é realizada atualmente por métodos solares (convecção natural), mas o aumento das taxas desta produção exige a aplicação de métodos de secagem industrial (Rahman, 2006). A otimização dos processos de secagem é uma importante ferramenta para melhorar os mesmos, com vista a otimizar a qualidade final dos produtos, o consumo de energia e rendimentos de operação (Di Scala & Crapiste, 2008). A secagem por convecção de ar é amplamente utilizado para a sua redução de equipamento e custo de operação, embora a manutenção da qualidade dos alimentos através deste processo tenha apresentado alguns problemas graves no passado (Ortiz & Lemus-Mondaca, 2013). As características de qualidade de alimentos secos podem ser agrupadas como física, química e nutricional. Dependendo dos valores destes parâmetros, o valor de mercado pode mudar e além disso, eles podem afetar a aceitabilidade de produtos secos, por parte do consumidor (Marinos-kouris & Maroulis, 2006).

Existem diversos tipos de secadores que podem ser adaptados para a secagem de algas. Os principais cuidados a ter em conta nestas adaptações são em relação ao controlo da temperatura do ar de secagem e, ao fumo em caso de sobreaquecimento da câmara de secagem. A Estufa é um aparelho elétrico utilizado para dessecação ou secagem de substâncias sólidas ou evaporações lentas de líquidos, com sistema de convecção natural de ar e sistema de aquecimento localizado nas laterais.

O secador *Tray drier* é um secador de tabuleiros que consiste numa secagem por ventilação, uma vez que a alga é inserida nos tabuleiros e o ar quente passa no mesmo local onde está a alga.

A liofilização é um tipo de secagem diferente das duas anteriores, pois é uma secagem a baixa temperatura. O material é colocado congelado e assim se conserva enquanto está a ser desidratado por sublimação sob vácuo, induzido pela baixa temperatura do liofilizador.

1.7- Conservação de alimentos

A preservação, o processamento e a distribuição de alimentos é um campo multidisciplinar, requerendo competente conhecimento em muitas áreas, nomeadamente as propriedades biológicas dos alimentos, tais como a microbiologia ou as reações bioquímicas, as propriedades físicas de biomateriais, tais como termofísica, a ligação da água e as propriedades estruturais. De salientar também os conceitos no campo da engenharia, como a transferência de calor e massa (Emerick, 2007).

Um processo térmico tem como principal objetivo reduzir a atividade de materiais biológicos indesejáveis, como os microrganismos e enzimas. Em alguns processos, a mudança nas propriedades físicas é desejada. Noutros casos, a destruição de nutrientes essenciais e outras mudanças indesejáveis tomam lugar. A utilização de altas temperaturas é um dos métodos mais utilizados para a preservação de alimentos. Alimentos de grande consumo são submetidos a um tratamento térmico destinado à redução da carga microbiana o que permite um aumento do tempo de vida do alimento.

A pasteurização é o tratamento térmico que destrói algumas, mas não todas as formas vegetativas presentes. O seu objetivo principal é eliminar bactérias patogénicas, mas não deterioradoras. Se o objetivo é prevenir deterioração, a pasteurização deve ser seguida por outros tratamentos, nomeadamente, a refrigeração, os aditivos químicos, as embalagens ou a fermentação.

A esterilização procura a inexistência de microrganismos viáveis no alimento. Assim, o alimento poderia ser armazenado indefinidamente e nenhuma deterioração microbiana deveria ocorrer. É possível produzir um recipiente selado absolutamente estéril pelo aquecimento a temperatura suficientemente alta por um longo período tempo.

Os sistemas de assepsia e filtração, não são um processo térmico como a pasteurização ou a esterilização, mas é utilizado nas indústrias alimentares, pois são bastante eficazes. Há vários tipos de filtração, ou melhor, a filtração está dividida em várias categorias, isto conforme o tamanho do poro da membrana, existe então a microfiltração, ultrafiltração e a nanofiltração.

A tecnologia de filtração tem vindo a ganhar uma maior aceitação no mercado internacional, por permitir a concentração e separação de constituintes de alimentos sem o uso do calor e conseqüentemente sem alteração organolética, as partículas são separadas em função do seu peso molecular e forma, com o uso de pressão e membranas semipermeáveis (Gava, A, 2008).

1.8- Aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são adicionados aos alimentos com o objetivo de melhorar o seu aspeto, aroma, ou prolongar a sua conservação. De um dodo geral são utilizados para, direta ou indiretamente, aumentarem o valor de mercado dos produtos alimentares.

Os aditivos alimentares são classificados em diferentes grupos, de acordo com a sua finalidade, podem ser corantes, aromatizantes, conservantes, espessantes, edulcorantes, entre outros. A ter em especial atenção aos edulcorantes, pois estes não são calóricos e vêm a apresentar um aumento de consumo significativo, pois estão relacionados com o controlo da obesidade e são consumidos tanto por questões de saúde como por questões estéticas. Alguns dos aditivos alimentares mais utilizados são o Acessulfame potássio, Aspartamo, Ácido cítrico, Frutose e o Sorbato de potássio.

1.8.1- Os edulcorantes

Atualmente utilizam-se substitutos do açúcar, nomeadamente os edulcorantes ou adoçantes que, como o próprio nome indica, substituem o açúcar na composição de alimentos. O uso deste tipo de aditivo alimentar começou a ser popularizado na década de 60, principalmente nos Estados Unidos. Desde então, têm sido objeto de muitas polémicas, em especial no que respeita à segurança para o organismo humano.

Os adoçantes ou edulcorantes são aditivos alimentares que são adicionados intencionalmente com finalidade tecnológica ou organolética em qualquer fase de processamento alimentar e podem ou não contribuir para o valor energético do género alimentício resultante. Os edulcorantes só podem ser usados na alimentação após rigorosa avaliação por instituições científicas competentes (ASAE, 2006).

A frutose é um edulcorante natural e nutritivo, ou seja, é obtido a partir de plantas ou eventualmente podem estar presentes em alimentos de origem animal e além de adoçar o alimento, fornece calorias ao organismo, e por isso é denominado calórico.

Vários estudos posteriores reforçaram a ideia de que a frutose, assim como o sorbitol, seriam benéficos na dieta de diabéticos (Barreiros, R, Bossolan, G & Trindade, CEP, 2005).

Acessulfame K é um edulcorante sintético e não nutritivo, pois este ao contrário da frutose é obtido por reações químicas apropriadas de produtos naturais. E além do sabor doce que tem, não fornece calorias ao organismo.

Foi descoberto em 1967 por investigadores alemães que também descobriram que as variações do posicionamento dos substituintes no anel causavam forte influência na doçura, concluindo-se que o sal de potássio era o mais adequado para aplicar em alimentos. É o edulcorante sintético com maior resistência ao armazenamento prolongado e a diferentes temperaturas, tem também um poder adoçante de 200 vezes superior à sacarose.

Segundo o Decreto-Lei nº 394/98, a quantidade máxima em bebidas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares para este edulcorante (Acessulfame K) é de 350 mg/l.

O Aspartamo está na mesma categoria do acessulfame k, é um edulcorante sintético e não nutritivo. É um dipeptídeo branco, cristalino, inodoro sem calorias e tem também um poder adoçante 180-200 vezes superior à sacarose.

Este é relativamente estável até 150°C, mas sob certas condições, como a temperatura, humidade e pH, este edulcorante pode ser hidrolisado formando novos compostos.

Segundo o Decreto-Lei nº 394/98, a quantidade máxima em bebidas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares para este edulcorante (Aspartamo) é de 600 mg/l.

1.8.2- Os conservantes

O princípio básico da conservação química reside na inibição da reação de oxidação dos componentes alimentares que são passíveis dessa reação na presença de oxigénio. Claro que o método mais eficaz é a remoção do oxigénio do alimento, mas como nem sempre é possível os conservantes são bastante utilizados na indústria alimentar. Existem vários tipos de conservantes, como os conservantes naturais e os conservantes sintéticos.

O Sorbato de potássio é ótimo para uso em diversos produtos alimentares. Tem a forma de grânulos esféricos, e portanto, reduz a formação de poeira (Stanojevic, Stefanovic, & Solujic, 2010).

Segundo o Decreto-Lei nº 365/98, para os vinhos brancos e tintos: até 27g/hL. Aviso: 27g/hL de sorbato de potássio aporta cerca de 200mg/L de ácido sórbico (limite legal

atual), e cerca de 70mg/L de potássio. Para os vinhos brancos e tintos: até 27g/hL. Aviso: 27g/hL de sorbato de potássio aporta cerca de 200mg/L de ácido sórbico (limite legal atual), e cerca de 70mg/L de potássio.

O Ácido cítrico é um conservante natural. Produto utilizado em alimentos em geral como bebidas, bebidas alcoólicas, aromas, frutas e vegetais frescos, congelados e enlatados, conservas, temperos, sobremesas, doces.

O ácido cítrico tem várias qualidades, para além da sua utilização na indústria alimentar humana, pode ser usado na indústria de produtos de limpeza, tratamento de água, fertilizantes, alimentos para animais, tornando o alimento mais agradável ao paladar, mascarando alguns gostos, e intensificando outros. Como acidulantes, ajusta o pH dos alimentos agindo como agente tampão. É utilizado como conservante (agente bacteriostático) prevenindo o crescimento de microrganismos ou do desenvolvimento de esporos de bactérias patogênicas. Atuam em sinergia com antioxidantes na preservação de gorduras e do escurecimento não enzimático de produtos. Retiram e sequestram metais que provocam a formação de complexos que aceleram a deterioração da cor, do sabor.

Neste caso específico é utilizado como regulador de acidez (ASAE, 2011)

Enquadramento, Objetivo e Desenho Experimental

2.1- Enquadramento

A indústria alimentar é uma área que se encontra em constante desenvolvimento, que combina a inovação tecnológica com a inovação cultural e social.

A procura dos consumidores por produtos diatéticos, diuréticos ou até mesmo os chamados produtos “*light*” tem subido em flecha pois, cada vez mais, o consumidor procura produtos saudáveis ou produtos cada vez mais naturais. O produto que se desenvolveu neste trabalho, sendo um chá de algas e chá verde, enquadra-se neste parâmetro, permitindo considerar que reúne as condições adequadas para ser um produto desejado pelo consumidor.

O aumento deste tipo de produtos, cada vez mais saudáveis, está relacionado com a procura por conveniência na vida atual, o que conduz à produção em larga escala de produtos alimentares de consumo imediato, onde o chá engarrafado se insere, pois simultaneamente é saudável e conveniente.

As algas são um dos produtos que, ao serem adicionados a diversos alimentos permitem aumentar a sua validade e, simultaneamente pelo seu alto valor nutritivo e atividade antioxidante, os benefícios para a saúde são reconhecidos mundialmente, estas são consumidas desde a antiguidade e hoje um pouco por toda a população mundial (McHugh, 2007).

2.2- Objetivo

O objetivo geral que sustentou a realização deste trabalho foi avaliar a capacidade de transferência de antioxidantes da alga *Fucus Spiralis* utilizada no chá tisana, bem como a sua adição ao chá verde. Deste modo, obter uma bebida saudável com enquadramento nos produtos diatéticos, com alta capacidade antioxidante e inovador para o mercado, constituiu o seu objetivo principal. O chá de algas com elevado poder antioxidante poderá ser futuramente comercializado na forma seca ou como bebida preparada após a tisana.

As algas edíveis são, em Portugal, um mercado pouco explorado, apesar das suas características nutricionais únicas e pela sua associação, quer ao bem-estar, quer a dietas nutricionalmente de excelência. Neste projeto pretendeu-se desenvolver um novo produto, um chá de algas, analisá-lo química e microbiologicamente e fazer ensaios ao consumidor, de modo a aumentar a utilização das algas edíveis enquanto alimento de excelência nutricional.

Para a concretização deste objetivo, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

Sendo que a primeira necessidade é verificar se os polifenóis ficam retidos na água após 10min de fervura.

- Estudar o aW e Teor de humidade da alga, quando acabada de apanhar e depois de seca: Liofilizada, Secador *Tray-drier* e Estufa ventilada.
- Verificar se os polifenóis eram extraídos e ficavam retidos na água após processo de tisana (10min de fervura).
- Observar o efeito do embalamento a vácuo na quantificação de polifenóis, ao longo do tempo (60 dias) para diferentes concentrações de alga (0,1; 0,5 e 1g). Ao longo desses 60 dias também a cor foi avaliada.
- Avaliar o efeito de três processos de conservação alimentar diferentes: Esterilização, Pasteurização e Filtração na estabilidade microbiológica, capacidade antioxidante e cor da tisana de algas com chá verde ao longo de 1 mês de armazenamento à temperatura ambiente.

2.3- Desenho Experimental

1ª Fase – Tratamento da alga:

Apanhou-se a alga no terreno, procedeu-se a uma lavagem e corte. Em seguida, secou-se a alga por três diferentes processos de secagem: Secador *Tray-drier*, Liofilizador e Estufa ventilada.

2ª Fase – Otimização da secagem da alga:

1. Para cada tipo de secagem foi medido o aW, o teor de humidade e quantificaram-se os polifenóis na água após fervura de 10 minutos.
2. Para cada tipo de secagem testou-se diferentes concentrações de alga em 300 ml (0,1g, 0,5g e 1g).

3ª Fase – Escolha da embalagem

1. Realizou-se o mesmo procedimento que na fase anterior, mas apenas com o processo de secagem escolhido, mas com alga embalada a vácuo e embalada sem vácuo.
2. Escolheu-se o melhor método de secagem e a concentração, através dos resultados obtidos.

4ª Fase – Desenvolvimento das tisanas com *Fucus spiralis* e chá verde:

1. Adicionou-se chá verde à concentração de alga escolhida;

2. Escolha sensorial da concentração de chá verde;
3. Escolha dos aditivos (acesulfame K, aspartamo, Ácido cítrico, frutose, sorbato de potássio e sumo de limão) sensorialmente.

5ª Fase – Engarrafamento e avaliação da estabilidade ao longo de um mês

1. Depois de escolher todos os aditivos e concentrações a utilizar, o chá foi sujeito a três processos de conservação diferentes, a Esterilização (Autoclave), a Pasteurização (Banho-Maria) e Filtração (Filtros 0,22 μ m).
2. Engarrafamento em garrafas estéreis sem tiosulfato.
3. Avaliação da cor, a capacidade antioxidante e os microrganismos totais ao tempo 0, 15 e 30 dias para os três processos de conservação utilizados.

Material e Métodos

3.1- Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho foram:

- Arca congeladora a -80°C Thermo, Electron Corporation;
- Secador, *Tray-drier*;
- Liofilizador, ScanVac Coolsafe 55-4;
- Estufa de secagem, WTB Binder 7200;
- Balança de precisão $\pm 0,0001$ g BL 120S, da Sartorius;
- Placas de agitação magnética e aquecimento, da VELPR Científica;
- Vórtex, Velp Científica;
- Banho termostaticado, Julabo SW22;
- Colorímetro Chroma Meter CR-400/410, da KONICA MINOLTA;
- Medidor de aW, Pidac Rotronic Hygropaln;
- Analisador de humidade, Mettler Toledo, HB 43;
- Autoclave, Trade Raypa;
- Câmara de fluxo, Telstar pv 30/70;
- Bomba de membrana para vácuo;
- Material de vidro diverso;
- Micropipetas de 20 μ L, de 200 μ L e de 1 mL, da VWR;
- Filtros, TPP 500ml 0,22 μ m;
- Papel de filtro nº1 da Whatman;
- Papel de filtro nº4 da Top Budget;
- Papel de filtro da Fioroni nº4;
- Sonda, Ebro;
- Reagente de Folin-Ciocalteu, Panreac;
- NaCO₃, Panreac;
- Acido Galico, Sigma;
- Garrafas, Deltalab 500ml, estéreis e sem tiosulfato;
- Placas de Petri esterilizadas Normax;
- Triptona sal, Merck;
- PCA, Merck;
- Bico de *bunsen*, Camping Gaz;
- Máquina de fazer vácuo, Busch – HenkoVac;
- Diverso material de cozinha;
- Estufa no LBO, Binder;

- Frigorífico, Beko;
- Leitor de placas, BioTek – Synergy H₁.

3.2- Recolha de amostras

As algas foram recolhidas na praia Marcos Neves, em Peniche, Portugal, sendo um local onde existe uma enorme fonte da mesma (*Fucus Spiralis*).

O chá utilizado no presente estudo foi da *Camellia sinensis*, com origem na Ásia e a sua empresa em Portugal é a Chá Hunos, Lda. A sua apresentação é em folhas e tem como característica principal serem plantas completamente de uso tradicional, sem qualquer tipo de aditivo. Porém estão sujeitas a alterações quando as regras de conservação não são as mais adequadas. Deve-se conservar num local seco e arejado, sem ser sujeito à exposição do sol.

Os reagentes utilizados no presente trabalho para as várias análises laboratoriais possuíam grau de pureza para alimentos e foram obtidos de diversas fontes externas: Himedia, Índia; Merck, Alemanha; Panreac, Espanha; Scharlau, Espanha e Sigma-Aldrich, EUA.

3.3- Processos de secagem

Os processos de secagem utilizados foram a liofilização, a secagem através de secador tray-drier e a secagem em estufa ventilada.

Na liofilização o processo foi feito a -60°, no liofilizador ScanVac Coolsafe 55-4, deixando a alga no seu interior aproximadamente 48h. No que diz respeito à estufa ventilada, o processo foi feito na estufa WTB Binder 7200 a 60°C. Até percebermos se a alga estava definitivamente seca, foi medido várias vezes o peso de uma pequena amostra na balança de precisão ($\pm 0,0001\text{g}$ BL 120S, Sartorius), até ao seu peso estabilizar.

No secador tray-drier, a alga foi inserida nos tabuleiros que o secador contém no seu interior e tanto a velocidade como a temperatura a que o ar sai foi controlada.

Devido a um problema técnico existente no secador, a temperatura máxima atingida foi de 44°C, demorando assim um pouco mais de tempo em relação à estufa. A forma de avaliar se a alga estava definitivamente seca foi igual ao processo anterior, isto é, recolhendo o peso várias vezes até que fique constante.

3.4- Preparação da amostra.

A preparação da amostra implicou vários processos. O primeiro consistiu na lavagem em laboratório com água do mar, de modo a remover organismos invertebrados,

areias e detritos. Após a lavagem, as algas foram pesadas, embaladas e congeladas a -80°C (Thermo, Electron Corporation). Depois de congeladas, foram para o liofilizador para posteriormente serem trituradas e embaladas.

Relativamente aos processos de secagem, através da estufa e do secador, o processo foi semelhante, retirando apenas a congelação, ou seja, iniciou-se com a lavagem em laboratório com água do mar, de modo a remover organismos invertebrados, areias e detritos. Uma amostra foi para a estufa, outra para o secador. Depois do processo de secagem, foram trituradas e pesadas, para depois serem também embaladas.

3.5- Aditivos alimentares

Os aditivos alimentares utilizados no presente trabalho para os vários testes sensoriais foram:

- Sorbato de potássio, Scharlau S.L;
- Sumo de limão 0,5%, Paquito Sirop receita da William;
- Aspartame, Canderel o adoçante normal;
- Acessulfame K, Sigma-Aldrich análises em alimentos;
- Ácido cítrico, Panreac uso alimentar;
- Frutose, marca Ignoramus produtos naturais.

3.6- Preparação do chá de algas

Os estudos realizados para diferentes situações, começando com o objetivo de observar se os polifenóis da alga ficavam retidos na água após a fervura e em diferentes concentrações da mesma, 0,1; 0,5 e 1g/300 mL. Depois de se observar esta situação, os restantes testes (pH, Cor e Polifenóis) foram feitos só para a alga, tanto embalada a vácuo como não. Este procedimento também foi realizado para o chá verde e para o veículo (água).

A humidade e o aW foram realizados na alga acabada de apanhar como também na alga após a secagem, para os três diferentes tipos de secagem utilizados.

A preparação do chá de algas iniciou-se com o aquecimento da água até aos 100°C . Obtendo esta temperatura, adicionou-se à água a alga *Fucus spiralis*, deixando 10min a ferver, retirou-se para posteriormente seguirmos com a filtração com um filtro n.º 4 (Filtres Fioroni), de modo a obter um líquido isento de partículas em suspensão.

O descrito refere-se à primeira fase de testes. Na segunda fase, o modo de preparação foi idêntico, sendo a única diferença a adição também de chá verde quando se adiciona a alga *Fucus spiralis*.

3.7- Estudos de Caracterização do Chá de Algas

3.7.1- Humidade

O teor de humidade foi um dos parâmetros físicos analisados, tanto para a alga acabada de apanhar como para a alga já seca pelos três diferentes métodos, tendo sido realizada com o auxílio de um analisador de humidade (Mettler Toledo, HB 43), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante (Santos, J. 2008). As medições foram todas efetuadas em triplicado.

3.7.2- aW

A atividade da água ou aw, definida como a razão entre a pressão do vapor de água de um alimento e a pressão do vapor da água pura, é a medida da quantidade de água disponível no alimento e que pode ser utilizada pelos microrganismos.

Estudos anteriores puderam inclusive comprovar que o conteúdo de água no sistema reacional pode ser melhor quantificado em termos de atividade da água, assim, o aW foi medido com o auxílio de um medidor de aW, Pidac (Rotronic Hygropaln) calibrado seguindo todas as instruções de trabalho que acompanham o mesmo.

As amostras das algas já trituradas foram introduzidas, cobrindo toda a área da caixa para melhorar os resultados obtidos. Este método foi utilizado depois da secagem pelos três diferentes tipos como para a alga fresca. Todos os ensaios foram feitos em triplicado.

3.7.3- Avaliação Instrumental da Cor

A medição da cor foi realizada diretamente pela leitura das coordenadas Cielab (L*, a* e b*) nas amostras, utilizando um colorímetro, que consiste num aparelho de medição, com uma área de diâmetro de 8 milímetros de medição e um processador de dados. Antes da medição, o colorímetro foi calibrado por uma cerâmica branca. O valor de L* representa a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco), o valor a* varia entre -60 (verde) e +60 (vermelho) e o valor b* varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo) (Sampaio & Correia, 2010).

Como para a medição do pH, as amostras foram guardadas no frigorífico a 4°C durante cerca de 24h. As medições foram realizadas numa célula para líquidos, onde foram colocadas as amostras e foram lidas em triplicado as coordenadas Cielab, à temperatura ambiente e a um ângulo de 0°.

Para o produto final foi calculado a variação total de cor, o ΔE , através da fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

ΔE , significa diferença de cor entre duas medidas espectrofotométricas.

3.7.4- Polifenóis Totais

A Quantificação Total de Polifenóis (QTP) foi realizada através do método de Follin-Ciocalteu em placas de 96 poços. O método consiste em adicionar 158 μ l de água destilada, 2 μ l de amostra e 10 μ l de reagente de Folin-Ciocalteu com posterior homogeneização numa placa de 96 poços protegida da luz. Após 2 minutos de repouso, adiciona-se 30 μ l de Na₂CO₃ a 20% (p/v), homogeneizando-se novamente, isto em cada poço da placa. A reação foi incubada por um período de 1 hora, em local protegido da luz, após o qual foi medida a absorvância a 755nm, num leitor de placas, BioTek – Synergy H1. Para a quantificação total de polifenóis foram ainda realizadas três soluções de ácido gálico preparadas a partir de uma solução de ácido gálico 0,3 mg/ml ($V_f = 5$ ml), tendo sido analisadas no espetrofotómetro Thermo Helios α com o mesmo comprimento de onda, para a posterior realização de uma curva padrão. Com a reta de regressão linear da curva padrão e com as absorvâncias das amostras, foi possível retirar-se as concentrações de polifenóis totais.

3.7.5- Provas sensoriais

A avaliação sensorial foi efetuada no laboratório de análise sensorial da ESTM. Este laboratório de análise sensorial está equipado com 10 cabines, todas elas cumprem as normas ISO 6658:1985; ISO 11035:1994; ISO 11036:1994 e a ISO 4121:1987. Os provadores são professores da escola e elementos do GIRM. São indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 40 anos. Foi proposta a análise a um grupo reduzido de pessoas, para apenas se decidir algumas concentrações.

Os atributos observados na análise sensorial foram a cor, o brilho, o odor e claro, o sabor. As amostras foram codificadas com um conjunto de 3 dígitos e, em cada análise, eram apresentados códigos distintos. A ordem de apresentação das amostras no tabuleiro entregue ao provador também era alterada e de acordo com a ordem que se encontrava na folha de prova. A codificação das amostras ocorreu para que a avaliação dos provadores não fosse influenciada e para que não se fizessem comparações com anteriores análises.

As provas sensoriais efetuadas foram de forma simples e em pequena escala. Foram 20 provas de tentativa erro, com todos os aditivos alimentares com diferentes concentrações, para encontramos a melhor receita possível.

3.7.6- Processos de conservação

Os processos térmicos usados na esterilização foram realizadas num autoclave (Trade Raypa), que efetua os registos do tempo, da temperatura e da pressão, no seu interior durante a esterilização. No frasco de *schott* foram registados os mesmos parâmetros, mas pela sonda introduzida no interior desta.

Foram estudados vários binómios $t - T^{\circ}$, com uma sonda (Ebro), até atingirmos o objetivo, isto é, o produto estar a 121° durante 15min. Assim, utilizámos uma T° de 123° durante 25min. Registaram-se os valores de tempo, temperatura e pressão do interior da autoclave (Trade Raypa) e do interior do frasco de *schott* (produto), no ponto de menor letalidade.

A razão da utilização desta temperatura deve-se ao facto de que, segundo o princípio HTST (high temperature short time), os produtos submetidos a processos equivalentes (em termos de eliminação de microrganismos), com temperaturas mais elevadas e tempos mais curtos, têm melhor qualidade final.

A pasteurização foi efetuada em banho termostatizado (Julabo SW22). Trata-se de um processo muito parecido com a esterilização, mas menos agressivo uma vez que opera a temperaturas mais reduzidas sendo usado para inativar as enzimas e destruir microrganismos patogénicos sensíveis ao calor que causam estragos com mínimas mudanças nas propriedades do produto. Sendo um processo pouco severo, utiliza temperaturas sempre abaixo dos 100°C . Neste caso foram usados no binómio $t-T^{\circ}$, a pasteurização lenta, 65° durante 30min. Foi escolhida esta opção devido a dificuldade em conseguir controlar o tempo de 15 a 20seg em banho-maria, usados no tipo de pasteurização rápida que é a 72° a 75° .

A assepsia e filtração definem-se como o conjunto de medidas que permitem manter algo isento de micróbios bem como da sua entrada, de onde resulta o prolongamento da qualidade dos produtos. A filtração utiliza-se sobretudo em produtos líquidos através do uso de filtros com um tamanho não superior a 0,45 micrómetros que ajudam a remover e a evitar a multiplicação de microrganismos (Val, 2013).

Neste caso usou-se filtros (TPP 500ml $0,22 \mu\text{m}$) e o processo foi efetuada com o auxílio de uma bomba de membrana para vácuo, numa câmara de fluxo (Telstar pv 30/70) para que não houvesse nenhuma contaminação cruzada.

3.7.7- Microbiologia

Na parte microbiológica, apenas foram medidos os microrganismos totais.

Sendo que o produto (tisana) é considerado a solução “mãe”, pois esta é uma amostra líquida, mediu-se 1 ml diretamente da amostra homogénea para tubo com 9 ml de triptona sal (Merck).

As amostras de microrganismos totais foram preparadas em condições de assepsia, segundo as Normas ISO 6887-2011, ISO 16649-2 (2001) e ISO 4833:2003.

Prepararam-se as diluições decimais até à diluição 10^{-6} .

Todas as diluições decimais, bem como as inoculações foram preparadas e realizadas em ambiente estéril assegurado por um bico de bunsen (Camping Gaz). Todas as incorporações foram realizadas em duplicado.

De acordo com as normas ISO 4833 (2003), ISO 6887 (1999 e 2003) e ISO 7218 (1996) semeou-se, por incorporação, 1ml de inóculo das diluições adequadas, dos grupos de amostras analisado e verteu-se cerca de 12 a 15 ml de PCA (Merck) em placas de Petri esterilizadas (Normax) e devidamente identificadas. Misturou-se cuidadosamente o inóculo com cerca de 10-12 ml de PCA derretido de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos e deixou-se solidificar à temperatura ambiente. Após o arrefecimento, incubaram-se as placas numa estufa (Binder) à temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante $72\text{h} \pm 3\text{h}$, não empilhando mais de 6 placas.

Determinou-se o número de microrganismos por contagem direta das colónias. Os resultados foram expressos em log UFC/g, relativamente ao chá.

Procedeu-se à contagem das colónias em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas que apresentem entre 25 e no máximo 250 colónias. Registou-se o nº total de colónias.

Para calcular o nº N de microrganismos por mL, efetuando a média ponderada, com a ajuda da equação seguinte:

$$N = \text{Soma de } C / (n_1 + 0,1n_2)d$$

Em que:

Soma de C - soma das colónias contadas nas 2 placas consideradas;

n_1 – nº de placas consideradas na 1ª diluição;

n_2 – nº de placas consideradas na 2ª diluição;

d - fator de diluição correspondente à 1ª diluição considerada.

Se a placa correspondente à amostra líquida ou à solução-mãe contiver menos de 25 colónias, o nº estimado (NE) é:

$$NE = c/d$$

Em que:

c - nº de colónias contadas;

d - fator diluição da solução-mãe.

Se a placa semeada a partir da solução-mãe não contiver qualquer colônia, o resultado deverá ser apresentado sob a seguinte forma:

Inferior a $1 \times 1/d$ colônias por grama

Em que:

d - corresponde ao fator de diluição da solução-mãe.

Apresentação do resultado:

O resultado expressa-se por um n° compreendido entre 1,0 e 9,9, multiplicado por 10^n sendo n o expoente de potência de 10 apropriado.

3.8- Produto final: chá de algas + chá verde

O produto final foi elaborado como o produto para testes (só alga), a preparação do produto, iniciou-se com o aquecimento da água até aos 100°C. Atingindo a esta temperatura, adicionou-se à água o chá verde e a alga, deixando 10min a ferver. Retirar para posteriormente se seguir a filtração com um filtro n.º 4 (Filtres Fioroni) de modo a obter um líquido com menos algumas partículas. Segue-se outra filtração, com filtros n.º4 (Top Budget) e com o auxílio de material de cozinha e por último a filtração mais rigorosa com filtros n.º1 (Whatman).

Após estes processos de filtração foram adicionados os aditivos alimentares, para posteriormente levar para o processo térmico e embalar o produto na câmara de fluxo (Telstar pv 30/70), para não haver qualquer contaminação cruzada para as garrafas (Deltalab 500ml), estéreis e sem tiosulfato. Depois de embalado o produto final foi guardado em ambiente fresco e protegido da luz solar. O produto final foi também caracterizado como descrito anteriormente (cor, polifenóis e microbiologia).

3.9- Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar as diferenças para os valores médios do pH, da humidade, do aW, da cor, quer ao longo do tempo, quer entre diferentes embalagens ou também para o produto final e dos polifenóis totais, quer ao longo do tempo, quer entre diferentes embalagens, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), com dois fatores (Zar, 2009). De referir que todos os pressupostos inerentes à realização da ANOVA (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Adicionalmente, sempre que foram detetadas diferenças significativas, realizaram-se os respetivos testes de comparações múltiplas, nomeadamente, o teste de *Tukey HSD* (Honestly Significant Difference) (Zar, 2009).

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância (α) de 5%, 1% ou 0,01% (ou seja, sempre que p -value $<$ 0,05, p -value $<$ 0,01 e p -value $<$ 0,001)

Todos os cálculos foram efetuados com recurso ao *software* GraphPad InStat 3 (Trial).

Todos os resultados são expressos como médias \pm desvio padrão (SD).

Resultados

4.1- Secagem

4.1.1- Secador Tray-drier

O método utilizado na secagem da alga *Fucus Spilaris* no secador *tray-drier* passou pela introdução da alga nos tabuleiros interiores do secador, controlando manualmente a temperatura e a velocidade do ar. A temperatura máxima atingida foi de 44°C e a alga esteve aproximadamente 4h no secador até o seu peso ficar constante. Tratou-se do método mais rápido devido à circulação do ar.

4.1.2- Estufa ventilada

O método utilizado na secagem da alga *Fucus Spilaris* na estufa foi similar ao utilizado no secador *tray-drier*, pois a alga foi inserida na estufa ventilada a 60°C, e só foi retirada quando o seu peso ficou constante, ou seja, quando perdeu quase toda a sua quantidade de água.

Neste caso, apesar da alga, durante nas primeiras horas perder bastante peso, a amostra só atingiu peso constante ao fim de 19h.

4.1.3- Liofilizador

O método utilizado na secagem da alga *Fucus Spilaris* no liofilizador foi um pouco diferente do utilizado nos anteriores dois processos, pois este processo requer que a amostra esteja congelada antes de ser liofilizada. Deste modo a alga, depois de limpa foi congelada a -80°C para, no dia seguinte ser colocada no liofilizador.

Este processo foi realizado em temperaturas negativas, -60°C e durou cerca de 48 horas.

4.2- Caracterização da alga *Fucus spiralis*

4.2.1- aW

O aW é a atividade da água livre na amostra. Define-se como a relação que existe entre a pressão de vapor de um alimento em relação com a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura e varia de 0 a 1. A atividade aquosa é um parâmetro inteiramente ligado à humidade do alimento, permitindo determinar a sua capacidade de conservação, ou seja, da propagação microbiana no interior do alimento (Domingues, 2008).

A atividade aquosa de um alimento pode ser reduzida, aumentando a concentração de solutos na fase aquosa dos alimentos mediante a extração da água (processo de secagem) ou mediante a adição de novos solutos. A atividade aquosa em conjunto

com a temperatura, o pH e o oxigênio, são os fatores que mais influenciam na estabilidade dos produtos alimentares.

Pela análise da figura 1, pode-se constatar que entre a alga fresca e os diferentes métodos existem diferenças estatisticamente significativamente na aW ($p < 0,001$). Verifica-se ainda que o método de secagem por liofilização apresentou um menor valor de aW ($0,169 \pm 0,005$), com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre todos os métodos de secagem. O método de secagem através da estufa ventilada apresentou ainda um valor de aW inferior ao método de secagem por secador tray-drier, $0,366 \pm 0,024$ e $0,479 \pm 0,001$, respectivamente.

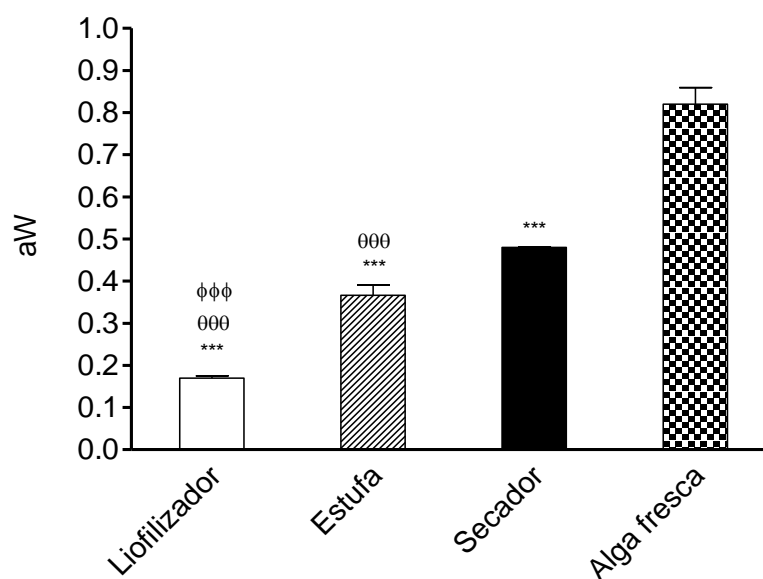


Figura 1 - aW da alga *Fucus spiralis* fresca e depois de seca, pelos três métodos de secagem. Os valores são a média \pm SD de 5 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação da alga fresca, 000 – quando comparado com a situação do secador, ΦΦΦ – quando comparado com a situação da estufa.

4.2.2- Humidade

A humidade relativa interfere diretamente na atividade de água do alimento. Se armazenarmos um alimento de baixo aW em ambiente com alta humidade relativa, a atividade da água do alimento aumentará, podendo sofrer deterioração pelo crescimento de microrganismos.

O binômio humidade relativa/temperatura não pode ser desprezado, sendo que, no geral, quanto mais elevada a temperatura de secagem, menor deverá ser a humidade

relativa, sendo o inverso também verdadeiro. Na figura 2 encontram-se representados os resultados da humidade da alga *Fucus spiralis* nas diferentes condições testadas. A alga fresca tem, em média, 73% de teor de água, verificando-se assim que todos os métodos de secagem são efetivos, mas, ainda assim, o secador tem diferenças estatisticamente significativas entre a secagem no liofilizador ($p < 0,001$) e entre a secagem na estufa ventilada ($p < 0,01$).

A liofilização e a secagem em estufa resultam em valores idênticos de humidade, não existindo diferenças significativas entre ambas.

Pode-se verificar que o método de secagem através da liofilização obteve um valor de humidade de $4,016 \pm 0,515$, inferior ao valor do método de secagem através da estufa ventilada $4,282 \pm 0,024$ e também inferior ao valor de secagem através do secador tray-drier, $8,260 \pm 0,865$.

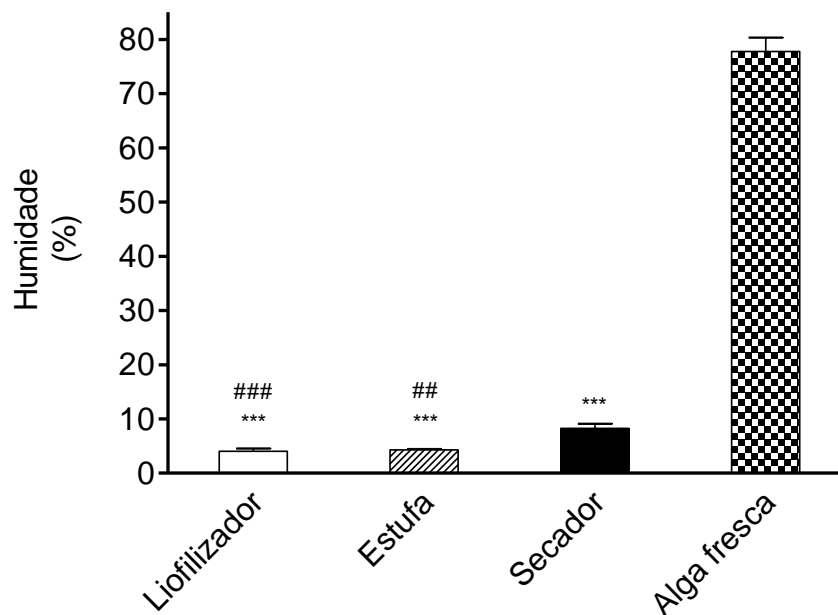


Figura 2 – Humidade da alga *Fucus spiralis* fresca e depois de seca, pelos três métodos de secagem. Os valores apresentados são a média \pm SD de 5 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação da alga fresca, ### – quando comparado com a situação do secador. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ## – quando comparado com a situação do secador.

4.3 - Capacidade antioxidante das tisanas da alga *Fucus spiralis*

4.3.1- Quantificação total de polifenóis (QTP)

A Quantificação total de polifenóis (QTP) da alga *Fucus Spilaris* foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, tal como descrito na secção anterior, obtendo-se os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por ml (mg EAG/ml).

Como se pode observar na figura 3, ocorreu transferência de polifenóis da alga *Fucus Spiralis* para a água, após fervura de 10min. Quando a alga foi seca por liofilização, ocorreu maior libertação de polifenóis para a tisana do que com o processo de secagem realizado com secador tray-drier e a estufa ventilada. As concentrações de polifenóis libertados para a água durante a realização da tisana foram de $0,093 \pm 0,017$ mg EAG/ml, de $0,246 \pm 0,049$ mg EAG/ml e de $0,298 \pm 0,048$ mg EAG/ml, para as concentrações de alga após liofilização de 0,1, 0,5 e 1,0 g, respetivamente. Existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre a concentração de 0,1g de alga liofilizada e as restantes concentrações de alga liofilizada. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os métodos de secagem para a concentração de alga 0,1g.

Para o método de secagem através do secador tray-drier observa-se um comportamento na libertação de polifenóis inferior, quando comparado com o processo de secagem pelo liofilizador. Nesta situação, para a concentração a 0,1g ($0,066 \pm 0,012$ mg EAG/ml), só existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) para a concentração de alga de 1g ($0,236 \pm 0,035$ mg EAG/ml), não existindo diferença entre as concentrações de 0,1g e 0,5g ($0,145 \pm 0,024$ mg EAG/ml). Para o processo de secagem da alga *Fucus spiralis* com a estufa ventilada, os resultados obtidos foram semelhante aos do liofilizador, pois a concentração de 0,1g ($0,069 \pm 0,008$ mg EAG/ml), tem diferenças estatisticamente significativas para as restantes concentrações, ou seja, para 0,5g ($0,165 \pm 0,034$ mg EAG/ml) e 1g ($0,250 \pm 0,033$ mg EAG/ml). Pela análise da mesma figura pode-se ainda observar que, entre os métodos de secagem, para a concentração de 0,5g, existe diferenças significativas ($p < 0,01$) entre a secagem no liofilizador e o secador tray-drier, bem como diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a secagem no liofilizador e a estufa ventilada. Deste modo é possível afirmar que existe uma maior libertação de polifenóis através da alga que é seca pelo processo de liofilização.

Para os resultados obtidos nas concentrações mais altas utilizadas de alga, ou seja, das concentrações de 1g, os resultados foram iguais aos obtidos para as

concentrações mais reduzidas, apesar de existir uma tendência para um aumento para as algas secas no liofilizador, estatisticamente, não existe diferenças entre os métodos de secagem.

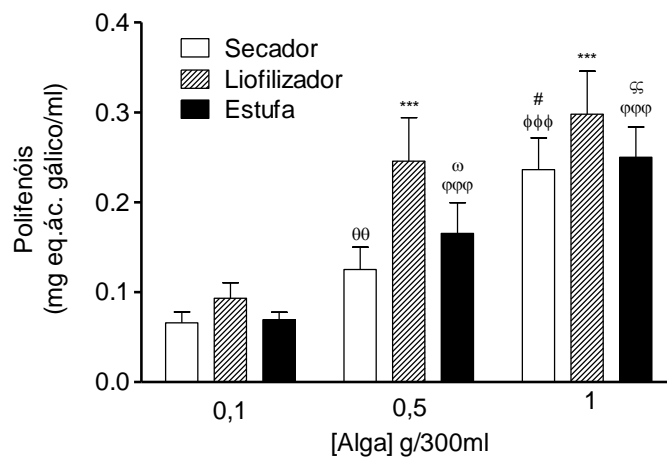


Figura 3 – Quantificação de polifenóis (mg de equivalentes de ácido gálico/ml) nas tisanas da alga *Fucus spiralis* para três métodos de secagem (secador; liofilizador, estufa) com diferentes concentrações de alga (0,1; 0,5 e 1 g/300ml). Os valores representam valores médios \pm SD de 5 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação do liofilizador para a concentração 0,1g/300ml, $\Phi\Phi\Phi$ – quando comparado com a situação do secador para a concentração 0,1g/300ml, $\phi\phi\phi$ – quando comparado com a situação da estufa para a concentração 0,1g/300ml. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): $\theta\theta$ – quando comparado com a situação do liofilizador para a concentração 0,5g/300ml, $\zeta\zeta$ – quando comparado com a situação da estufa para a concentração 0,5g/300ml. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): # – quando comparado com a situação do secador para a concentração 0,5g/300ml, ω – quando comparado com a situação do liofilizador para a concentração 0,5g/300ml.

4.4- Embalagem da alga a vácuo

Com esta etapa queria-se observar se existiriam diferenças significativas entre a alga embalada a vácuo ou não.

4.4.1- Quantificação total de polifenóis (QTP) com embalagem em vácuo e sem embalar a vácuo

Na figura 4 pode-se observar que as diferenças até aos 60 dias, da alga seca e embalada a vácuo e sem embalar a vácuo. Verifica-se que para a concentração de

0,1g/300mL de alga quando seca pelo processo de liofilização, a quantidade de polifenóis quantificados, ao fim dos 60 dias embalado a vácuo foi de $0,025 \pm 0,009$ mg EAG/ml e sem embalar a vácuo foi de $0,016 \pm 0,002$ mg EAG/ml, não existindo diferenças estatisticamente significativas.

Pode-se também verificar na figura 4, que existe uma pequena diminuição entre os resultados aos 0 e os 15 dias. A alga embalada a vácuo nos 15 dias teve uma concentração de polifenóis de $0,050 \pm 0,011$ mg EAG/ml, enquanto que ao ser embalada a vácuo o resultado obtido ao fim de 15 dias foi de $0,027 \pm 0,003$ mg EAG/ml, ou seja, diminui quase para metade. Para esta concentração de alga (0,1g/300mL) apenas existem diferenças substâncias entre embalar a vácuo ou não apenas entre os primeiros dias.

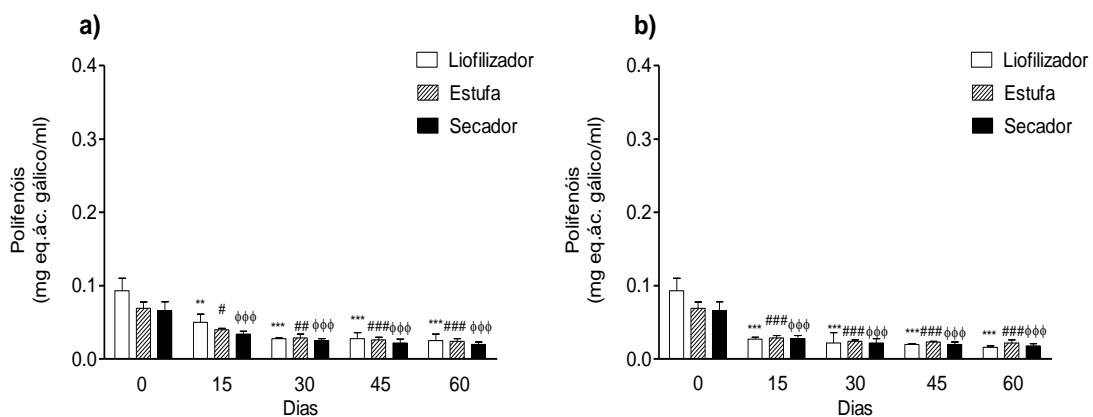


Figura 4 – Quantificação de polifenóis (mg de equivalentes de ácido gálico/ml) nas tisanas da alga *Fucus spiralis* durante 60 dias, pelos três métodos de secagem, para a concentração 0,1g/300mL de alga embalada a vácuo (a) e sem ser embalada a vácuo (b). Os valores representam valores médios \pm SD de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação do liofilizador nos 0 dias para o restante dos dias, ### – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias para o restante dos dias, $\Phi\Phi\Phi$ – quando comparado com a situação do liofilizador nos 0 dias com o restante dos dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ** – quando comparado com a situação do liofilizador no dia 0, ## – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias para o restante dos dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): # – quando comparado com a situação da estufa no dia 0.

Na figura 5 pode-se observar que a diferença até aos 60 dias, da alga seca e embalada a vácuo e sem embalar a vácuo para a concentração de 0,5 g/300 mL. Para o processo de liofilização da alga (0,5g/300mL), a concentração de polifenóis ao fim dos 60 dias embalado a vácuo foi de $0,061 \pm 0,009$ mg EAG/ml e sem embalar a vácuo foi de $0,053 \pm 0,008$ mg EAG/ml. Como na concentração de 0,1g embalando a vácuo, para 0,5g o resultado foi ligeiramente superior, no entanto não existem diferenças significativas.

Pode-se também observar na figura 5 que a alga embalada a vácuo após 15 dias teve um valor de $0,116 \pm 0,015$ mg EAG/ml. A alga não embalada a vácuo a concentração de polifenóis após 15 dias foi de $0,075 \pm 0,007$ mg EAG/ml, aqui ao contrário do resultado para a concentração de 0,1g, a diferença já é notória entre alga embalada a vácuo para os dias iniciais.

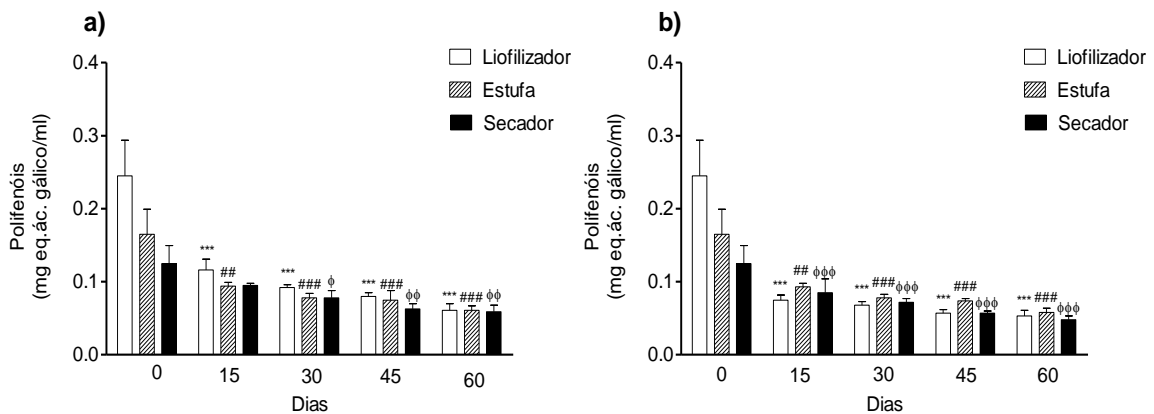


Figura 5 – Quantificação de polifenóis (mg de equivalentes de ácido gálico/ml) nas tisanas da alga *Fucus spiralis* durante 60 dias, pelos três métodos de secagem, para a concentração 0,5g/300mL de alga embalada a vácuo (a) e sem ser embalada a vácuo (b). Os valores representam valores médios \pm SD de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação do liofilizador nos 0 dias para o restante dos dias, ### – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias para o restante dos dias, ΦΦΦ – quando comparado com a situação do secador nos 0 dias com o restante dos dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ## – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias, ΦΦ – quando comparado com a situação do secador nos 0 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): Φ – quando comparado com a situação do secador nos 0 dias.

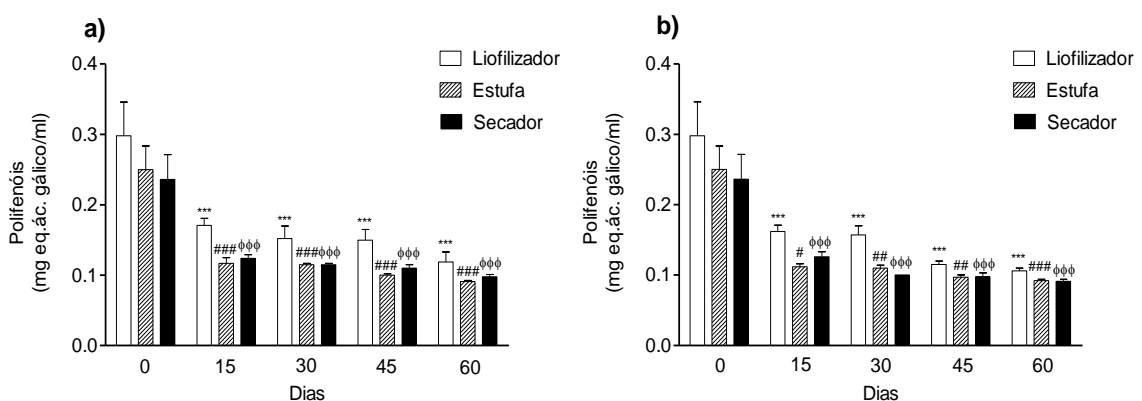


Figura 6 – Quantificação de polifenóis (mg de equivalentes de ácido gálico/ml) nas tisanas da alga *Fucus spiralis* durante 60 dias, pelos três métodos de secagem, para a concentração 0,5g/300mL de alga embalada a vácuo (a) e sem ser embalada a vácuo (b). Os valores representam valores médios \pm SD de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam

diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação do liofilizador nos 0 dias para o restante dos dias, ### – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias para o restante dos dias, ΦΦΦ – quando comparado com a situação do secador nos 0 dias para o restante dos dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ** – quando comparado com a situação do liofilizador nos 0 dias para o restante dos dias, ## – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias para o restante dos dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): # – quando comparado com a situação da estufa nos 0 dias para o restante dos dias.

Na figura 6 observa-se que para a concentração de 1g/300mL de alga liofilizada, ao fim dos 60 dias embalado a vácuo, a concentração de polifenóis foi de $0,117 \pm 0,014$ mg EAG/ml e sem embalar a vácuo foi de $0,106 \pm 0,004$ mg EAG/ml, não existindo diferenças significativas.

Como já foi referido anteriormente, os resultados obtidos são bastante positivos, conseguindo diferenciar os dois métodos de embalar, o que faz todo o sentido, pois retirando o oxigénio (vácuo), a deterioração será menor, obtendo resultados superiores com este método, embora que estatisticamente esta diferença não seja significativa ao fim dos 60 dias.

Um dos objetivos do presente estudo foi concluído com sucesso, verificando-se que a perda de antioxidantes ocorre essencialmente durante os primeiros 15 dias, mantendo-se relativamente constante até aos 60 dias, facto que é interessante na perspetiva futura da comercialização da alga em saquetas de chá para que o consumidor possa fazer a sua infusão em casa.

4.5- Tisana de Fucus spiralis com chá verde

Como referido anteriormente, o objetivo foi produzir um chá de algas com chá verde para obter um poder antioxidante superior. Dessa forma realizou-se a quantificação de polifenóis com diferentes concentrações de chá verde e alga. O resultado para a mistura entre o chá verde e a alga (0,5g + 0,5g) foi de $0,375 \pm 0,012$ mg EAG/ml, seguindo-se o resultado mais próximo para 1g de chá verde ($0,323 \pm 0,031$ mg EAG/ml), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os valores referidos. Já para a concentração de alga a 1g ($0,277 \pm 0,041$ mg EAG/ml) relativamente à mistura, existem diferenças significativas ($p < 0,01$).

Também foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), comparando a concentração de 0,5g de chá verde cujo resultado obtido foi de $0,295 \pm 0,018$ mg EAG/ml, com a mistura de 50% entre chá verde e alga. Para o resultado da concentração de 0,5g de alga ($0,225 \pm 0,012$ mg EAG/ml), existem diferenças significativas ($p < 0,001$) com a mistura de 50% entre chá verde e alga, também com diferenças significativas ($p < 0,01$) quando comparado com a situação do chá verde a

1g, e com diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com a situação do chá verde a 0,5g.

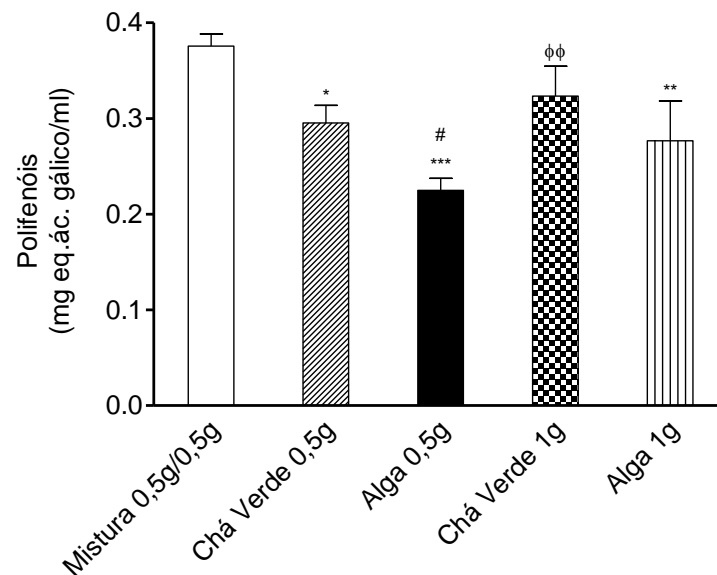


Figura 7 - Quantificação de polifenóis (mg de equivalentes de ácido gálico/ml) em tisanas com diferentes concentrações de chá verde, alga e mistura de chá verde e alga em 300 mL de água. Os valores representam valores médios \pm SD de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a mistura de 50% de cada com a alga de 0,5g. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ** – quando comparado com a mistura de 50% de cada com a alga de 1g, ΦΦ – quando comparado com a situação de alga a 0,5g com o chá verde a 1g. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): * – quando comparado com a mistura de 50% de cada com o chá verde de 0,5g, # – quando comparado com a situação do chá verde a 0,5g com a alga a 0,5g.

4.6- Provas sensoriais realizadas

A análise sensorial permite determinar diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos e ainda determinar se o consumidor deteta diferenças nos produtos e se os mesmos são aceites ou não pelo consumidor. É de salientar que neste estudo específico as provas sensoriais foram reduzidas a um número pequeno de provadores, apenas para decidir a concentração de alga a utilizar, 0,1g, 0,5g ou 1g. Em relação à concentração a utilizar de aditivos alimentares, procedeu-se do mesmo modo, também com um número pequeno de provadores. Foram produzidas 20 diferentes amostras de tisanas, variando as concentrações dos aditivos alimentares, até chegar à concentração tida como mais adequada.

Depois de todas as análises efetuadas a preferência do painel foi para a formulação constituída por:

- Acessulfame K – 0,05g/L
- Aspartamo – 0,135g/L
- Frutose – 0,5g/L
- Ácido cítrico – 0,008g/L
- Sorbato de potássio – 0,05g/L

Após a inclusão da “receita” aprovada pelo painel, foram testados três diferentes métodos de conservação (figura 8).



Figura 8 – Tisanas depois de todos os processos térmicos (Filtração, Esterilização e Pasteurização) e depois de embalado.

4.7. Produto final – processos de conservação

4.7.1- Microbiologia

Em relação à microbiologia no presente estudo, decidiu-se realizar apenas contagem de microrganismos totais para o chá já embalado e pronto para consumo. Para esta análise decidiu-se fazer a contagem no tempo de 0, 15 e 30 dias.

Tabela 1 – Contagem de microrganismos totais após o processo de conservação (0 dias). Para todas as contagens foram realizadas duas replicas e sempre em duplicado. A bebida foi a solução mãe, utilizada para as diluições sucessivas.

	Bebida	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Esterilização	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Pasteurização	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Filtração	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Como ilustra a tabela 1, os valores relativos à análise microbiológica do chá após os diferentes processos térmicos e a embalagem, revelaram que as contagens de microrganismos totais foram todos <1 , ou seja, $0,0 \times 10^0$ UFC/ml para ambos os casos. Após 15 dias realizou-se a segunda contagem, encontrando-se os resultados na tabela 2. Os valores máximos obtidos nas contagens de microrganismos totais foram registados para o processo de pasteurização, $1,3 \times 10^3$ UFC/ml, tendo as contagens mais baixas sido registadas para a esterilização e filtração, $0,0 \times 10^0$ UFC/ml.

Tabela 2 – Contagem de microrganismos totais após o processo de conservação (15 dias). Para todas as contagens foram realizadas duas replicas e sempre em duplicado. A bebida foi a solução mãe, utilizada para as diluições sucessivas.

Bebida	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Esterilização	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Pasteurização	172	124	22	4	12	4
Filtração	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Passados 30 dias, os resultados obtidos foram substancialmente diferentes (tabela 3). O processo de filtração continuou a ter os valores mais baixos, $0,0 \times 10^0$ UFC/ml, já no caso da esterilização, que nos 15 dias também tinha $0,0 \times 10^0$ UFC/ml, o resultado dos 30 dias foi bastante superior, $9,3 \times 10^4$ UFC/ml, na pasteurização foi impossível obter o valor, pois as placas estavam incontáveis até à diluição -5, todas elas com um “tapete” de microrganismos.

Tabela 3 – Contagem de microrganismos totais após o processo de conservação (15 dias). Para todas as contagens foram realizadas duas replicas e sempre em duplicado. A bebida foi a solução mãe, utilizada para as diluições sucessivas.

Bebida	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Esterilização	+300	+300	+300	184	29	2
Pasteurização	+300	+300	+300	+300	+300	+300
Filtração	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Depois de incubadas as placas, relativas à contagem de microrganismos totais, registaram-se o crescimento de dois tipos de colónias. A maioria das colónias detetadas eram muito pequenas, mas em bastante número e com uma coloração um pouco cor-de-laranja (pasteurização), em menor número foram observadas colónias com coloração bege e com aspeto gelatinoso. A observação ao microscópio não se revelou esclarecedora. Os dois tipos de colónias obtidas desenvolveram-se nos dois diferentes métodos de conservação. No que diz respeito à pasteurização no dia 30, já foi diferente, observando-se um “tapete” desde a solução mãe até a placa -5.

4.7.2- Polifenóis

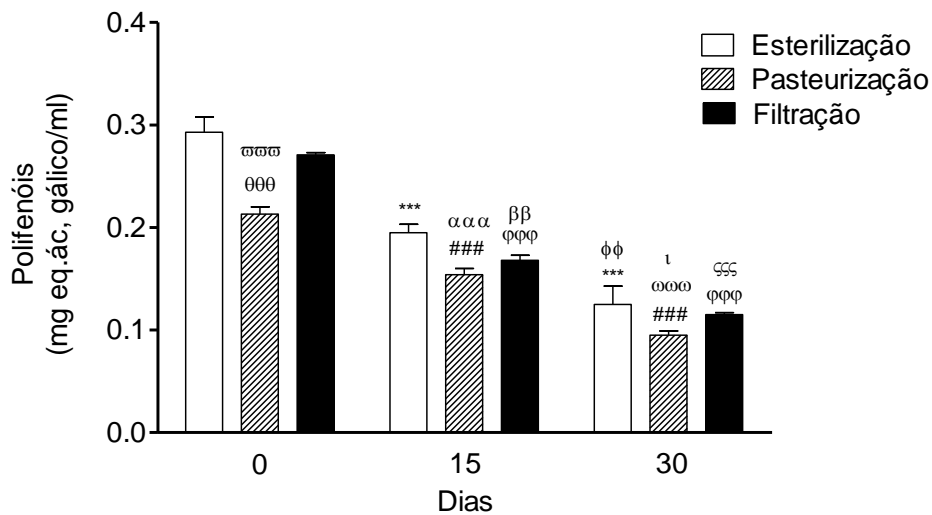


Figura 9 - Quantificação de polifenóis (mg de equivalentes de ácido gálico/ml) nas tisanas da alga *Fucus spiralis* para três métodos de conservação (esterilização; pasteurização, filtração) desde os 0 aos 30 dias. Os valores representam valores médios \pm SD de 5 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação da esterilização nos 0 dias para o restante dos dias, ### – quando comparado com a situação da pasteurização nos 0 dias para o restante dos dias, φφφ – quando comparado com a situação da filtração nos 0 dias, ωωω – quando comparado com a situação da pasteurização nos 15 dias para o restante dos dias, ζζζ – quando comparado com a situação da filtração nos 15 dias, θθθ – quando comparado com a situação entre a esterilização e a pasteurização nos 0 dias, ααα – quando comparado com a situação entre a esterilização e a pasteurização nos 15 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ΦΦ – quando comparado com a situação da esterilização nos 15 dias para o restante dos dias, ββ – quando comparado com a situação entre a pasteurização e a filtração nos 15 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): ι – quando comparado com a situação entre a esterilização e a pasteurização nos 30 dias.

Pode-se observar pela análise da figura 9 que o processo térmico de conservação por esterilização está associado ao maior valor de polifenóis tanto no tempo 0 ($0,293 \pm 0,015$ mg EAG/ml), como no tempo 30 ($0,125 \pm 0,018$ mg EAG/ml).

No tempo 0, as diferenças entre os processos são visíveis, tanto na esterilização ($0,293 \pm 0,015$ mg EAG/ml) como na filtração ($0,271 \pm 0,002$ mg EAG/ml) têm diferenças ($p < 0,001$) para com o processo de pasteurização ($0,213 \pm 0,007$ mg EAG/ml). Entre a esterilização e a filtração não existem diferenças estatisticamente significativas.

Verificou-se ainda que aos 15 dias, existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre o processo de esterilização ($0,195 \pm 0,008$ mg EAG/ml) e a pasteurização ($0,154 \pm 0,006$ mg EAG/ml), também existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre os processos de pasteurização e de filtração ($0,168 \pm 0,005$ mg EAG/ml).

Contudo após os 30 dias, não existem diferenças significativas entre o processo de esterilização ($0,125 \pm 0,018$ mg EAG/ml) e filtração ($0,115 \pm 0,002$ mg EAG/ml), mas entre a esterilização e a pasteurização ($0,095 \pm 0,004$ mg EAG/ml).

4.7.3- Cor

Macroscopicamente foi possível verificar alterações de cor entre os três processos conservação, esterilização, filtração e pasteurização, tal como pode ser verificado pela análise da figura 10, 11 e 12.



Figura 10 – Garrafa de tisanas Esterilizado com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde.



Figura 11 - Garrafa de tisanas Filtrado com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde.



Figura 12 - Garrafa de tisanas Pasteurizado com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde.

Macroscopicamente, consegue-se observar essas diferenças, sendo que a tisana que foi esterilizada (figura 10) apresenta uma coloração mais escura que os outros processos, filtração e pasteurização. Este foi o processo que eleva a tisana a maior temperatura, cerca de 123°C durante 25min, isto para que se consiga que o produto (tisanas) esteja a 121°C durante 15min.

A pasteurização, contrariamente à esterilização é a que apresenta uma cor mais clara (figura 12). A filtração ao contrário dos outros dois processos, em vez de sofrer um processo térmico sofre uma filtração realizada com um filtro de 0,22 μm na camara de fluxo, para que a assepsia seja a maior possível.

Depois de se observar as diferenças macroscopicamente, realizou-se uma avaliação de cor através do método de Cielab (L^* , a^* e b^*). Os resultados encontram-se apresentados nas figuras 13, 14 e 15.

Foram determinados os valores de ΔE (diferença de cor entre duas medidas espectrofotométricas), tal como descrito nos métodos.

Os valores de ΔE tiveram como base os valores de L^* , a^* e b^* do produto final após os processos de esterilização, pasteurização e filtração.

Consegue-se observar pela análise da figura 13, que o processo de esterilização tem um valor inferior de luminosidade quando comparado com os outros processos, logo a sua cor é mais escura, tal como observado macroscopicamente (figura 10) (Sampaio & Correia, 2010).

Os valores do ΔE (figura 16) foram semelhantes para todos ao longo do tempo, não existindo diferenças estatisticamente. Para o processo de esterilização, no tempo 0 o valor de ΔE foi de 22,16, no tempo 15 foi de 22,03 e no tempo 30 foi de 21,98. Já para o processo de filtração no tempo 0 o valor de ΔE foi de, 23,51, no tempo 15 foi 23,60 e no tempo 30 foi 23,68, já no terceiro processo, a pasteurização os valores de ΔE foram os mais altos, para o tempo 0 o valor obtido foi de 24,19, no tempo 15 foi 24,36 e no tempo 30 foi de 24,40.

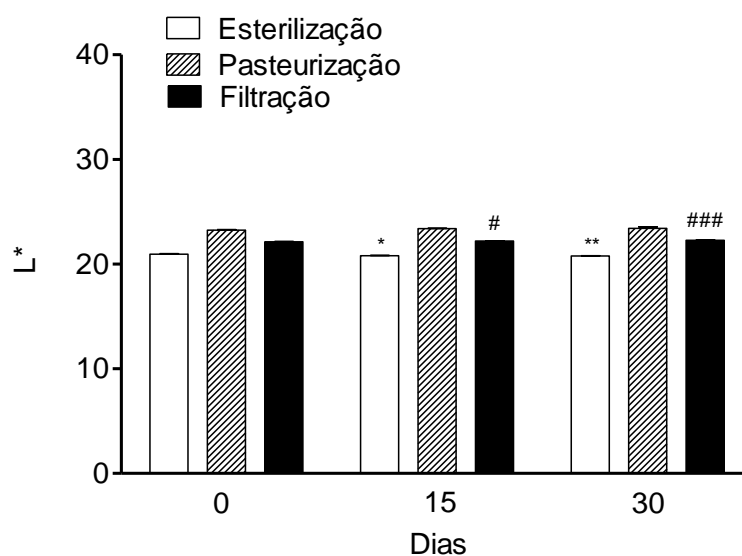


Figura 13 – Quantificação do parâmetro de cor L^* em tisanas com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde para três processos de conservação, esterilização, pasteurização e filtração. Os valores são a média \pm SD dos parâmetros de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): ### – quando comparado com a situação da filtração nos 0 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ** – quando comparado com a situação da esterilização nos 0 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): # – quando comparado com a situação da filtração nos 0 dias. * – quando comparado com a situação da esterilização nos 0 dias.

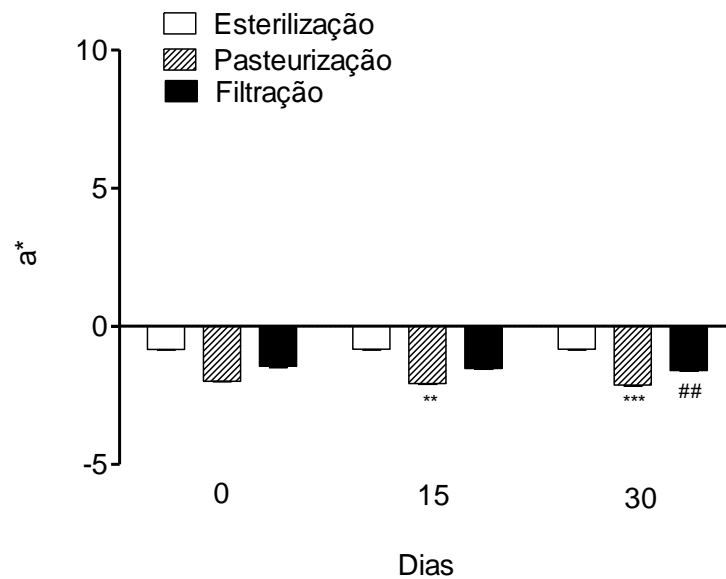


Figura 14 - Quantificação do parâmetro de cor a^* em tisanas com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde para três processos de conservação, esterilização, pasteurização e filtração. Os valores são a média \pm SD dos parâmetros de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): *** – quando comparado com a situação da esterilização nos 0 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ** – quando comparado com a situação da esterilização nos 0 dias e ## – quando comparado com a situação da filtração nos 0 dias.

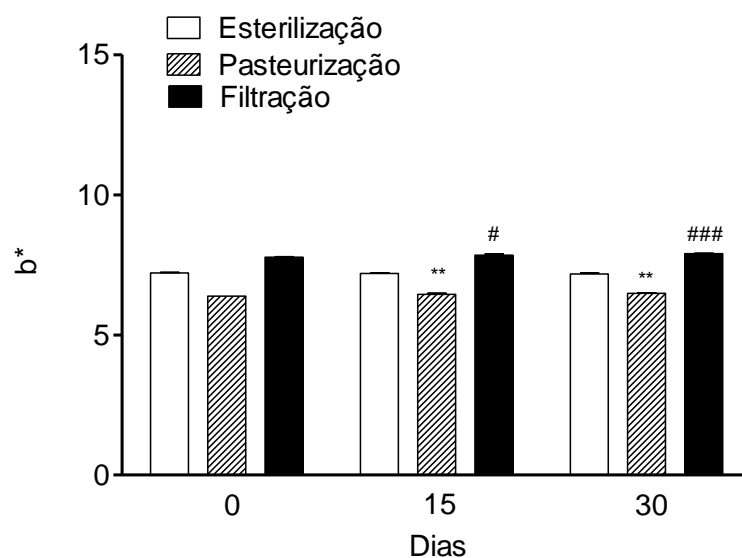


Figura 15 - Quantificação do parâmetro de cor L^* em tisanas com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde para três processos de conservação, esterilização, pasteurização e filtração. Os valores são a média \pm SD dos parâmetros de 3 experiências independentes. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,001$): ### – quando comparado com a situação da filtração nos 0 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,01$): ** – quando comparado com a situação da pasteurização nos 0 dias. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): # – quando comparado com a situação da pasteurização nos 0 dias.

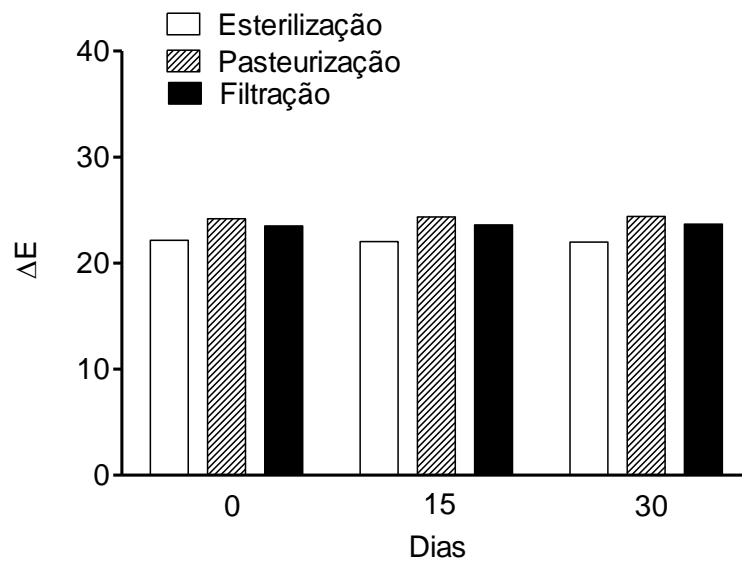


Figura 16 - Quantificação do ΔE em tisanas com 0,5g/300mL de alga e 0,5g/300mL de chá verde para três processos de conservação, esterilização, pasteurização e filtração. Os valores são a média \pm SD dos parâmetros de 3 experiências independentes. Não existem diferenças estatisticamente significativas.

Discussão

A exploração dos oceanos está em rápido crescimento como é evidenciado pela expansão as patentes para produtos marinhos, incluindo algas. O investimento em esforços de investigação sobre algas foi recentemente identificado como a principal força para o desenvolvimento de um mercado biotecnológico de produtos derivados de algas

(Mazarrasa, I., 2014).

As algas castanhas formam a classe das *Phaeophyceae*, que se acredita ter surgido entre 200 e 150 anos atrás. Esta classe é representada por 1.760 espécies diferentes divididas em 18 ordens diferentes. As algas castanhas mostram uma enorme variação na forma e tamanho, variando de finos filamentos a complexas estruturas. São as algas mais diversas e abundantes nos mares frios e também o grupo de macroalgas para os quais está disponível o maior número de estudos sobre atividades biológicas (Hayes, M. 2012).

A ordem Fucales (classe Phaeophyceae) atualmente inclui 520 espécies (Hayes, M. 2012) de algas castanhas encontradas a zona intertidal marinha em todo o mundo, particularmente em regiões frias e temperadas (Hayes, M. 2012).

Especificando, a *Fucus spiralis*, tem como habitat natural a zona intertidal marinha. Esta passa 90% do tempo fora de água está sujeita a suportar condições extremas de seca, salinidade, radiações, herbívoros, bactérias patogénicas e epífitas (Salvador N., 2007). Por estes motivos, esta alga adaptou uma forma de sobreviver a todos estes fatores que são preponderantes na produção de novas moléculas com atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, entre outras (Lambert, J, Yang, 2003). Tal facto foi comprovado em trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo de investigação (Pintéus, 2011), onde a quantificação total de polifenóis (QTP) através do método Folin-Ciocalteu foi testado em três frações de algas diferentes e a *Fucus spiralis*, foi a alga que apresentou uma maior quantidade de polifenóis ($\pm 41,54$ mg EAG/g de extrato total) (Pintéus, 2011). Estes resultados justificam a escolha desta alga, uma alga comestível, para o desenvolvimento do produto a que este trabalho se propôs.

No desenvolvimento de novos produtos uma das etapas mais cruciais é a caracterização e o processamento dos seus constituintes (Mital, A., 2011). Neste sentido a utilização da alga seca tornou-se crucial para o desenvolvimento do produto em causa, no entanto diversas técnicas podem ser utilizadas para o efeito. Neste trabalho, a desidratação da alga foi realizada por três métodos, o secador, o liofilizador e a estufa. Embora nos três métodos a secagem da alga tenha sido, macroscopicamente, completa, a técnica de liofilização foi a mais eficiente, isto porque a amostra depois de liofilizada, comparativamente com as outras duas técnicas,

apresentou um valor de a_w inferior, o que torna a amostra mais estável e menos perecível. Embora os resultados da percentagem de humidade não tenham sido tão díspares comparativamente com a secagem através da estufa ventilada, o processo de liofilização apresentou diferenças estatisticamente significativas para o processo de secagem através do secador. Marcando assim, uma vez mais, a vantagem da utilização do liofilizador no processo de secagem (Bhandari, B., 2013).

As algas castanhas têm sido amplamente estudadas, principalmente pela sua capacidade antioxidante, por possuírem um grupo único de moléculas denominadas florotaninas e por muitas delas serem edíveis. As florotaninas são o maior grupo de polifenóis presentes nas algas castanhas, que quando purificados demonstram possuir uma forte capacidade antioxidante (Wang et al., 2009). Sabe-se que a produção destes compostos, constituintes da parede celular, nomeadamente da *Fucus spiralis*, tem funções de regeneração celular, bem como de defesa contra fungos e bactérias e proteção contra herbívoros, proteção ultravioleta e são consideradas substâncias osmorreguladoras (Schoenwaelder e Wiencke, 2000). Para além destas características, demonstram possuir uma forte capacidade antioxidante e como tal, têm sido alvo de diversos estudos para o tratamento profilático de doenças como por exemplo as doenças cardiovasculares, disfunção erétil e cancro (Kang et al., 2003). Para além das florotaninas, já foram identificados em algas castanhas outros compostos fenólicos como fucóis, fluretóis, fucofluretóis, fucoxantina, entre outros (Sadati et al., 2011).

Neste sentido, este trabalho propôs-se a desenvolver um produto com elevada capacidade antioxidante recorrendo à utilização da alga *Fucus spiralis*. Contudo, uma das desvantagens das moléculas bioativas produzidas por este tipo de organismos marinhos é a pouca resistência a elevadas temperaturas (Fitzgerald, C., 2014). Pelo que existiu a necessidade de confirmar a capacidade de resiliência às elevadas temperaturas por parte dos polifenóis presentes na alga. Para tal, deixou-se a alga em água a ferver durante 10 minutos e realizou-se a quantificação total de polifenóis (QTP). A medição de QTP das tisanas desenvolvidas com *Fucus spiralis* demonstrou uma elevada capacidade antioxidante, contudo foi verificado uma quantidade inferior de polifenóis, comparativamente com a análise desenvolvida anteriormente no seio do grupo de trabalho onde este estudo se incorporou (Rodrigues, I., 2011). Esta diferença sustancial de QTP entre os dois trabalhos não se deve tanto ao facto das elevadas temperaturas necessárias para desenvolver as tisanas, mas sim às diferentes concentrações de alga utilizadas, bem como ao método de extração utilizado, principalmente em relação aos solventes. Pelo que a utilização desta alga demonstrou

ser indicada para desenvolver um produto tisanas com um elevado teor de antioxidante.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a secagem e embalagem a vácuo permite uma melhor conservação do alimento, tanto a nível microbiológico como químico. Isto porque a ausência de oxigénio na embalagem diminui a oxidação do produto e inibe a proliferação de microrganismos aeróbios (Pavelková, A., 2013).

O embalagem a vácuo da alga *Fucus spiralis* no presente trabalho não apresentou vantagens significativas comparativamente com o embalagem comum. Ao longo de 60 dias de armazenamento, foi analisada a quantificação total de polifenóis da alga, onde se verificou uma relação direta com a concentração da mesma. O tipo de embalagem não demonstrou ter influência no potencial antioxidante da alga. Uma justificação para este resultado pode ser a elevada estabilidade que a alga e os seus constituintes têm após a sua desidratação. No produto em estudo constatou-se que o processo de secagem influencia mais, comparativamente com o processo de embalagem.

Comparativamente com o método de embalagem, a escolha do processo de secagem tem uma maior influência no potencial antioxidante, pelo que num possível *scale up* industrial, deverá ser dada maior atenção ao método de secagem do que ao método de embalagem.

Tal como referido anteriormente, um dos principais objetivos do trabalho foi desenvolver um produto tisanas com *Fucus spiralis* com elevado poder antioxidante e, após a análise dos resultados respeitantes à quantidade total de polifenóis, verificou-se que as concentrações de 0,5g e 1g foram as que obtiveram melhores resultados, contudo a diferença verificada entre as duas quantidades não foi significativa para que se optasse pela quantidade superior. Embora as tisanas desenvolvidas com 0,5g de alga apresentasse um elevado poder antioxidante, relativamente à quantidade de alga, tinha-se o intuito de desenvolver um produto com maior capacidade antioxidante, pelo que a adição de chá verde mostrou ser uma boa opção tanto ao nível sensorial como a nível químico.

O chá verde tem sido introduzido na dieta ocidental na última década devido aos seus benefícios. Este chá tem origem nas folhas de *Camellia sinensis* e tem sido alvo de diversos estudos que têm demonstrado que o consumo deste chá está associado a importantes benefícios para a saúde, nomeadamente a redução do colesterol, combate na prisão de ventre, também estimula o bom funcionamento do fígado e patologias relacionadas com o défice de antioxidantes e prevenção de doenças

tumorais ligadas ao pulmão, ao fígado, ao estômago, ao esôfago e à pele (Johnson, J. J., 2010).

Dulce M.A. Gil e colaboradores (2011) avaliaram a quantidade de polifenóis presentes no chá verde, onde constataram que este apresenta para 100 ml de água, 110 mg EAG/g de chá, o que vai de encontro com os resultados do presente no estudo, onde a quantidade total de polifenóis se apresentada nas mesmas unidades teria 107,7 mg EAG/g de chá. Esta elevada quantidade de polifenóis deve-se sobretudo às catequinas, um grupo de fenóis muito característico e presente em grandes quantidades no chá verde (Lloret, M., & Schmalko, M. (2012).

Neste sentido, o chá verde demonstrou ser um excelente aditivo para as tisanas com um elevado potencial antioxidante. A característica de atividade antioxidante do chá verde foi também verificada neste trabalho, quando a sua adição nas tisanas desenvolvidas com alga. O incremento de polifenóis no produto final é claramente visível e estatisticamente superior comparativamente às tisanas produzidas apenas com a alga *Fucus spiralis*. Embora o chá verde e a alga tenham por si só quantidades apreciáveis de polifenóis, na mistura final não se verifica a soma da atividade antioxidante das duas diferentes origens, mas sim um aumento da quantidade de polifenóis comparativamente com as duas diferentes origens.

Nas tisanas desenvolvidas neste trabalho existiu também a necessidade de adicionar na sua formulação alguns aditivos alimentares com o objetivo de melhorar as características organoléticas do produto e também para efeitos de conservação. Embora a avaliação sensorial do produto tenha sido reduzida a um pequeno painel de provadores constatou-se que a alga transferia um flavour e aroma muito intenso para a tisana, sendo necessária a adição de alguns aditivos como o acesulfame potássio, aspartamo e frutose, de forma melhorar as características organoléticas do produto final. Para além destes, os aditivos sorbato de potássio e ácido cítrico foram adicionados com a intenção de aumentar o tempo de vida do produto. Por sua vez, o ácido cítrico também tem a função de regular a acidez do mesmo.

A conservação dos alimentos numa fase de comercialização do produto torna-se uma etapa importante. Isto porque um grande período de vida é sempre o mais desejado pela indústria e pelo consumidor final. Neste sentido, os processos térmicos têm um papel predominante na indústria, uma vez que são eficazes e economicamente viáveis. A esterilização é um método muito utilizado e com resultados garantidos uma vez que este processo elimina os microrganismos viáveis no alimento. Sendo que quando realizado num recipiente absolutamente selado e estéril, o período de validade do produto aumenta consideravelmente. No presente trabalho a esterilização do

produto final demonstrou ter bons resultados durante os primeiros 15 dias, onde se verificou uma carga microbiana muito reduzida. No entanto, a contagem de microrganismos totais aeróbios presentes no produto ao fim de 30 dias demonstrou uma elevada carga microbiana respetiva a este processo térmico.

A pasteurização, embora seja um processo menos agressivo, é um processo bastante idêntico à esterilização e também bastante utilizado na indústria. Neste sentido recorreu-se à sua utilização para verificar se aumentaria o período de vida das tisanas desenvolvidas. Onde se constatou, comparativamente com a esterilização, que o processo de pasteurização apresentou uma carga microbiana superior ao fim dos primeiros 15 dias. Este resultado seria expectável uma vez que o processo de pasteurização decorre durante um maior período de tempo, mas a temperaturas inferiores. Pelo que a resistência de alguns microrganismos a temperaturas mais baixas, dentro de uma gama de altas temperaturas, pode ser suficiente para resistir ficando viáveis no fim do processo de pasteurização.

A conservação de alimentos pode também recorrer a processos físicos, como a filtração. Este processo recorre a filtros com um tamanho não superior a 0,45 micrómetros que ajudam a remover e a evitar a multiplicação de microrganismos, sem recorrer a elevadas temperaturas. A filtração tem sido alvo de estudo, isto porque as características dos produtos mantêm-se mais estáveis, no entanto torna-se um processo bastante dispendioso e industrialmente ainda com pouca aceitação. No presente trabalho a filtração foi o processo que demonstrou melhores resultados ao nível da conservação, comparativamente com a esterilização e com a pasteurização. Sendo que ao fim de 30 dias de conservação as tisanas não apresentaram quaisquer unidades formadoras de colónias (UFC's), mostrando assim que o produto conservado por filtração apresenta um maior tempo de vida útil.

Como referido anteriormente, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um produto tisanas com elevada capacidade antioxidante recorrendo a algas. Desta forma existiu a necessidade de avaliar qual seria o melhor tratamento de conservação que mantivesse o potencial antioxidante desejado. Neste sentido foi quantificada a quantidade total de polifenóis durante o mesmo período utilizado para os ensaios de conservação (30 dias). Nesta avaliação verificou-se que os tratamentos esterilização e filtração no início do referido período apresentaram uma quantidade de polifenóis considerável e idêntica, ao contrário do processo de pasteurização que apresentou uma quantidade de polifenóis bastante reduzida em comparação com os restantes processos. Estes dados podem sugerir que os polifenóis conseguem resistir a elevadas temperaturas, mas por curtos períodos de tempo, o que acontece com a esterilização. Ao contrário, na pasteurização a temperatura mantém-se elevada

durante grandes períodos de tempo, o que pode destabilizar os polifenóis. Embora a esterilização e a filtração tenham demonstrado melhores resultados, ao longo deste período a quantidade total de polifenóis foi decrescendo em todos os métodos de conservação ao longo do tempo. Esta diminuição de polifenóis pode também ser observada quando se compara o produto antes e depois da adição dos aditivos de melhoramento organoléptico e de conservação. Esta constatação leva à conclusão de que o decréscimo de polifenóis pode estar associado à adição de moléculas e às interações que estas podem ter com os polifenóis.

Ronald L. Prior e colaboradores (2005) demonstraram que a avaliação do potencial antioxidante de soluções ricas em polifenóis com a adição de outras moléculas (como por exemplo, frutose, ácido ascórbico) apenas pelo método Folin-Ciocalteu poderá ser uma análise redutora e imprecisa. As moléculas adicionadas podem reagir com os polifenóis presentes na solução e ocultam a sua presença aquando da determinação de polifenóis pelo método Folin-Ciocalteu. Estes resultados vão de encontro com os obtidos neste trabalho, uma vez que antes da adição dos referidos aditivos a quantidade total de polifenóis foi superior. Tal facto pode indicar que as tisanas desenvolvidas podem ter ainda um maior potencial antioxidante devido à presença da alga *Fucus spiralis* e do chá verde, apresentando-se como um produto inovador e de valor acrescentado para a indústria alimentar.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Conclusões e Perspetivas Futuras

Como referido anteriormente, as algas fazem parte da dieta de vários povos há vários séculos e, atualmente, verifica-se um acentuado aumento da sua utilização em outras diferentes e variadas dietas.

As algas marinhas estão também associadas cientificamente a altos valores nutritivos devido ao seu baixo valor em calorias e gorduras. Com a evolução dos tempos, cada vez mais a saúde e o bem-estar estão no topo das preocupações da população mundial, tornando assim as algas um ingrediente alimentar essencial na dieta mundial.

Neste momento existem tendências de mercado para produtos light, dietéticos ou diuréticos e o poder antioxidante é um parâmetro extraordinariamente importante para que o produto seja realmente eficaz.

Pode-se afirmar que foram obtidas várias conclusões positivas na realização do presente trabalho.

A primeira conclusão a destacar foi o facto de os polifenóis serem extraídos para a água das tisanas após 10 minutos de fervura. Em segundo lugar, a alga seca através do processo de liofilização tem um rendimento superior aos processos realizados através da estufa e do secador. Para cada um dos métodos de secagem foram usadas três diferentes concentrações de alga, 0,1g, 0,5g e 1g, permitindo-nos afirmar que o resultado obtido para a concentração de 0,1g é muito inferior ao das outras duas concentrações. Contudo a diferença entre a concentração de 0,5g e de 1g não é significativa na maioria dos casos, facto importante para a produção industrial. O poder antioxidante (polifenóis), a cor, o pH, o aW e o teor de humidade, foram os parâmetros de estudo deste trabalho que permitiram validar as afirmações anteriores.

A atividade antioxidante e a cor foram medidos em diferentes circunstâncias. O poder antioxidante, tal como já foi referido, era essencial no projeto por se considerar um produto inovador na área da dietética e a cor, pois a primeira imagem que o consumidor tem é visual. No aW e no teor de humidade não foi só a alga seca pelos três métodos de secagem, como também a alga fresca, acabada de apanhar. Também os valores obtidos para a atividade da água e para a humidade revelaram que o processo de liofilização acabou por ter um rendimento superior.

Ainda relativamente aos polifenóis e à cor, estes parâmetros foram medidos também ao longo de 60 dias com o intuito de observar se estes não se alteravam muito em relação ao tempo 0. Foi possível observar que existem diminuição dos polifenóis ao longo do tempo.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Tendo em conta que no mundo empresarial qualquer redução de custo é muito importante, decidiu-se também observar se existiriam diferenças no tipo de embalagem da alga a vácuo ou não. Assim sendo, voltou-se a medir os polifenóis e a cor ao longo de 60 dias, permitindo concluir que o investimento para fazer o embalagem a vácuo não seria necessário, pois os valores obtidos não apresentam diferenças significativas.

Tendo em consideração todos os resultados obtidos até aqui, conclui-se que utilizando a concentração de 0,5g de alga liofilizada, poder-se-ia comercializar saquetas com 0,5g para o consumidor final fazer a sua própria infusão. No entanto, outro do objetivo do trabalho passou pela formulação de uma bebida embalada, onde também se utilizou 0,5g de alga liofilizada. Nesta fase os estudos também foram efetuados com o chá verde.

A concentração de chá verde escolhida para os testes foi igual à de alga, ou seja, 0,5g.

Realizou-se também uma pequena prova sensorial entre um grupo restrito de elementos. Para que, por tentativa erro se decidisse a concentração dos aditivos alimentares a utilizar no produto final. Os resultados foram unânimes.

Prosseguiu-se para os processos térmicos, tendo sido os utilizados a esterilização, a pasteurização e também um processo de filtração a 0,22 μ m.

Nesta fase do estudo, foram também analisados os polifenóis, a cor e os microrganismos totais.

Os três parâmetros foram também medidos ao longo do tempo, mas desta vez em apenas 30 dias.

Em relação aos polifenóis, os resultados foram positivos. No processo de esterilização, onde se obteve os melhores resultados, não diferindo muito do processo de filtração, sendo o processo de pasteurização o processo em que os resultados são menos promissores.

Ao nível da cor, os resultados também foram bastante diferentes, sendo que o produto que foi esterilizado apresentava uma cor bastante mais escura que os outros dois processos, a filtração e a pasteurização.

Em relação ao estudo da microbiologia, inicialmente, todos os métodos estavam como o esperado, ou seja, <1 de microrganismos encontrados. Com o passar do tempo e ao

Conclusões e Perspetivas Futuras

final dos 15 dias, o chá que foi pasteurizado já apresentou contaminação, não se verificando tal facto no chá que foi esterilizado e filtrado.

Decorridos 30 dias, a contaminação permaneceu no chá pasteurizado, e surgiu também no chá esterilizado, enquanto o chá filtrado continuou sem nenhuma contaminação. De referir que todos eles foram bem “engarrafados”, pois tal processo ocorreu numa câmara de fluxo com garrafas estéreis. Os resultados obtidos ao fim de 30 dias na bebida sujeita a filtração demonstram a eficácia do processo de engarrafamento.

No final do estudo conseguiu-se obter uma conclusão concreta, que consiste na escolha da concentração de 0,5g de alga e de 0,5g de chá verde, bem como na seleção da filtração (0,22 μ m) como o processo para a inibição do aparecimento de microrganismos.

Perspetivando o futuro, considera-se essencial a continuação das análises por um período superior de tempo de modo a confirmar-se o prolongamento do tempo de prateleira deste produto.

Seria também interessante proceder a uma análise microbiológica mais específica ao produto, de forma a avaliar a estabilidade microbiana do mesmo, apesar de se estar a trabalhar com o produto microbiologicamente estável.

A nível sensorial era muito interessante treinar um painel de provadores e traçar o perfil sensorial do chá para se conseguir compreender onde se pode melhorar o produto final obtido neste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Albuquerque, A. P. (2014). Avaliação do uso de chás (*Camellia sinensis*) e infusão da casca de cebola (*Allium cepa* L.) como corantes naturais para tingimento de tecidos de algodão.
- Awasom, I. (2011). Tea. *Journal of Agricultural & Food Information*, 12(1), 12-22.
- Baldissera, A. C., Della Betta, F., Penna, A. L. B., & Lindner, J. D. D. (2011). Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(4), 1497-1526.
- Balduino, M. (2012). Aplicação da metodologia de engenharia Kansei na análise de consumo de chás. Dissertação de Mestrado. Faculdade de ciências da universidade do Porto.
- Barreiros, R. C., Bossolan, G., & Trindade, C. E. P. (2005). Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev. nutr*, 18(3), 377-389.
- Basu, T. K., Temple, N. J., & Garg, M. L. (Eds.). (1999). *Antioxidants in human health and disease*. CABI Pub..
- Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A., Esquível, M.M. 2001. Produção de Extractos para a Indústria Alimentar: Uso de Fluidos Supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*. 73, 14-21.
- Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M., & Schuck, P. (Eds.). (2013). *Handbook of food powders: Processes and properties*. Elsevier.
- Borrelli, F., Capasso, R., Russo, A., & Ernst, E. (2004). Green tea and gastrointestinal cancer risk. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 19(5), 497-510.
- Bureau, I. M. (2010). *The Canadian Consumer Behaviour , Attitudes and Perceptions Toward Food Products*.
- Cardoso, G. A. (2011). Efeito do consumo de chá verde aliado ou não ao treinamento de força sobre a composição corporal e taxa metabólica de repouso em mulheres com sobrepeso ou obesas.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(21), 7984-7991.

- Carter, B. E., & Drewnowski, A. (2012). Beverages containing soluble fiber, caffeine, and green tea catechins suppress hunger and lead to less energy consumption at the next meal. *Appetite*, 59(3), 755–61.
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in south East Asia. *LWT- Food Science and Technology*, 41: 1067 - 1072.
- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25(4), 155-171.
- Denny, M. W. Gaines, S. D. (2007). *Encyclopedia of Tidepools & Rocky Shores*. University of California Press. London, England, United Kingdom.
- Díaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2008). Dietary fiber and antioxidant capacity in fucus vesiculosus products. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 1 - 12.
- Di Scala, K., & Crapiste, G. (2008). Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 789-795.
- Domingues, J. C. D. R. (2008). Sistema HACCP: Implementação do sistema de autocontrole num Catering de aviação. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária.
- Emerick, M. C., Montenegro, K. B. M., & Degraeve, W. (2007). *Novas tecnologias na genética humana: avanços e impactos para a saúde*. FIOCRUZ.
- Fitzgerald, C., Gallagher, E., Doran, L., Auty, M., Prieto, J., & Hayes, M. (2014). Increasing the health benefits of bread: Assessment of the physical and sensory qualities of bread formulated using a renin inhibitory *Palmaria palmata* protein hydrolysate. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 398-405.
- Freitas, H. C. P., & Navarro, F. (2012). O chá verde induz o emagrecimento e auxilia no tratamento da obesidade e suas comorbidades. *RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, 1(2).
- Gava, A. (2008) *Tecnologia de alimentos. Princípios e aplicações*.

- Ghosh, P., Misra, A. K., Bhattacharya, A. K., Trivedi, N., Ghosh, A., Ghosh, I., & De, S. (2012). The Effect of Tea in Cerebrovascular Disease. *STUDIES ON ETHNO-MEDICINE*, 6(3), 161-166.
- Gil, D. M. D. A. (2011). Biosensor evaluation of the antioxidant activity of wines and teas. Interference studies and comparison with other.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L., Mira, L., & Corvo, M. L. (2008). Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 15(16), 1586-1605.
- Harbowy, M. E., Balentine, D. A., Davies, A. P., & Cai, Y. (1997). Tea chemistry. *Critical reviews in plant sciences*, 16(5), 415-480.
- Hayes, M. (2012). *Marine Bioactive Compounds*. Springer.
- Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W., & Jeon, Y. J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613-1623.
- Johnson, J. J., Bailey, H. H., & Mukhtar, H. (2010). Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective. *Phytomedicine*, 17(1), 3-13.
- Kang, K., Park, Y., Hwang, H. J., Kim, S. H., Lee, J. G., & Shin, H. C. (2003). Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Archives of pharmacal research*, 26(4), 286-293.
- Khan, N., Syed, D. N., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2013). Fisetin: a dietary antioxidant for health promotion. *Antioxidants & redox signaling*, 19(2), 151-162.
- Kim, Y. K., Jombart, L., Valentin, D., & Kim, K. O. (2013). A cross-cultural study using Napping®: Do Korean and French consumers perceive various green tea products differently?. *Food Research International*, 53(1), 534-542.
- Kwabi – Addo, B. (2011). *Cancer Causes and Controversies: Understanding Risk Reduction and Prevention*. Praeger. Santa Barbara, Califórnia, United States of America.
- Lambert, J. D., & Yang, C. S. (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 201-208.

Referências Bibliográficas

- Ledesma, N. (2009). *Nutrition & Breast Cancer*. Women's Health Matters. University of California, San Francisco.
- Lee, S. H., & Jeon, Y. J. (2013). Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia*, 86, 129-136.
- Lidon, F., Silvestre, M. M. (2007) *Industrias Alimentares. Aditivos e Tecnologia*. Escolar Editora, Portugal (ISBN 978-972-592-203-3).
- Lima, V. Melo, E. 2004. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Food Technol* 7. 187-190.
- Lima, J. D., Mazzafera, P., Moraes, W. D. S., & Silva, R. B. D. (2009). Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, 39(4), 1270-1278.
- Lloret, M., & Schmalko, M. (2012). Differences in quality parameters between types of commercial tea from Argentina. *International Journal of food studies*, 2(October), 168–178.
- López-Lopez , I; Bastida, S. (2009). Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science*, 83, 492–498.
- Mageid, M. M. A. E., & Salama, N. A. Saleh, M.A.M., Taleb, H.M.A (2009). Antioxidant and antimicrobial characteristics of red and brown algae extracts. . 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture. 818-828.
- Mahan, L. K.; Escott-Stump, S. (2005) Krause. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 11 edição. São Paulo. Roca.
- Manach, C., Scalbert, A., & Morand, C. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–47.
- Marinos-kouris, D., & Maroulis, Z. B. (2006). *Transport Properties in the Drying of Solids*. Handbook of industrial drying.
- Mattar, H., (2004). *Caderno Temático: A nutrição e o consumo consciente*. Instituto Akatu. São Paulo. Takano Editora.

Referências Bibliográficas

- Mazarrasa, I., Olsen, Y. S., Mayol, E., Marbà, N., & Duarte, C. M. (2014). Global unbalance in seaweed production, research effort and biotechnology markets. *Biotechnology advances*. Elsevier.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523.
- Mital, A., Desai, A., Subramanian, A., & Mital, A. (2011). *Product development: a structured approach to design and manufacture*. Butterworth-Heinemann.
- Morais, S. M., Cavalcanti, E. S., Costa, S. M., & Aguiar, L. A. (2009). Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Braz J Pharmacognosy*, 19(1B), 315-320.
- Morita, T., Niwa, K., Fujimoto, K., Kasai, H., Yamada, H., Nishiutch, K., Imanaka, T. (2010). Detection and activity of iodine-131 in brown algae collected in the Japanese coastal areas. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3443-3447.
- Nagao, T., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2007). A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity*, 15(6), 1473-1483.
- Nishiyama, M. F., Costa, M. A. F., Costa, A. M. D., Souza, C. G. M. D., Bôer, C. G., Bracht, C. K., & Peralta, R. M. (2010). Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciênc Tecnol Aliment*, 30(Supl 1), 191-6.
- Onofrejevová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S. & Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 464-470.
- Ortiz, J., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Puente-Díaz, L., Zura-Bravo, L., & Aubourg, S. (2013). Influence of air-drying temperature on drying kinetics, colour, firmness and biochemical characteristics of Atlantic salmon fillets. *Food chemistry*, 139(1), 162-169.
- Panel, E., & Nda, A. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to L-theanine from *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (tea) and improvement of alleviation of psychological stress. *EFSA Journal* 2011;9(6):2238.

- Pavelková, A., Kacániová, M., Horská, A., Rovná, L., Hleba, L., Petrová J. (2013). The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. *Anaerobe*
- Pintéus, S. (2011). Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioativos com elevado potencial biotecnológico. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Leiria.
- Pintéus, S., & Alves, C. (2009). High antioxidant potencial of *Fucus spiralis* extracts collected from Peniche coast (Portugal). *New Biotechnology*, 25(September).
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 450-455.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10), 4290-4302.
- Rahman, M. S. (2006). Drying of Fish and Seafood, 9–12. *Handbook of Industrial Drying*.
- Reinbach, H. C., Smeets, A., Martinussen, T., Møller, P., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2009). Effects of capsaicin, green tea and CH-19 sweet pepper on appetite and energy intake in humans in negative and positive energy balance. *Clinical nutrition*, 28(3), 260-265.
- Rodrigues, I. (2011). Produção e caracterização da capacidade antioxidante de gelo suplementado com extrato de *Fucus spiralis*. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Leiria.
- Sadati, N., Khanavi, M., Mahrokh, A., Nabavi, S. M. B., Sohrabipour, J., & Hadjiakhoondi, A. (2011). Comparison of antioxidant activity and total phenolic contents of some persian gulf marine algae. *Journal of Medicinal Plants*.
- Salvador, N., Gómez Garreta, A., Lavelli, L., & Ribera, M. A. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*, 71(1), 101-114.
- Sampaio, M. D., Freitas, A. P. D., & Araújo, R. P. C. D. (2010). Análise espectrofotométrica do clareamento dental interno. *RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)*, 58(3), 363-368.

- Santos, J. 2008. Filites de Pregado (*Psetta maxima*). Embalados em Atmosfera Modificada. Avaliação da qualidade física, química e microbiológica. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Scheibmeir, H. D., & Christensen, K. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive & critical care nursing: the official journal of the British Association of Critical Care Nurses*, 21(1), 24–8.
- Schoenwaelder, M. E., & Wiencke, A. C. (2000). Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere fucoids. *Plant Biology*, 2(1), 24-33.
- Schmitz, W., Saito, A. Y., Estevão, D., & Saridakis, H. O. (2005). O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências biológicas e da saúde*, 26(2), 119-130.
- Silva, R. A., Petter, C. O., & Schneider, I. A. H. (2007). Avaliação da perda da coloração artificial de ágatas. *Revista Escola de Minas*, 60(3), 477-482.
- Stanojevic, D., Stefanovic, O., & Solujic, S. (2010). In vitro synergistic antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(1), 109–115.
- Steele, J. H., Thorpe, S. A., Turekian, K. K. (2009). *Marine Biology: A Derivative of the Encyclopedia of Ocean Sciences*. Second Edition. Elsevier. Oxford, United Kingdom.
- Taylor, & Francis. (2011). *Journal of Agricultural & Food*. *Journal of Agricultural & Food Information*, (October), 37–41.
- Thielecke, F., & Boschmann, M. (2009). Phytochemistry The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – A review. *Phytochemistry*, 70(1), 11–24.
- Tringali, C. (2003). *Bioactive Compounds from Natural sources: Isolation, Characterization and biological properties*. CRC Press.

Referências Bibliográficas

- Tsai, C. F., Hsu, Y. W., Ting, H. C., Huang, C. F., & Yen, C. C. (2013). The *in vivo* antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). *Food chemistry*, 136(3), 1337-1344.
- Valério, D. J. (2013). *Gestão sustentável da água em empreendimentos turísticos*. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Lisboa.
- Van Kleef, E., Van Trijp, J. C. M., Van Den Borne, J. J. G. C., & Zondervan, C. (2012). Successful development of satiety enhancing food products: towards a multidisciplinary agenda of research challenges. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(7), 611-628.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Clavería, R., Quispe, I., Vergara, J., Uribe, E., & Di Scala, K. (2011). Effect of air temperature on drying kinetics and quality characteristics of osmo-treated jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 16-23.
- Wang, F. J., Kang, S. K., Pan, C. L., & Wu, S. C. (2011). Composition of Two Seaweed-Oligosaccharide-Lysates Derived from Agarase As-II and Their Ferrous-Chelating Antioxidant Power. *Journal of Marine Science and Technology*, 19(5), 557-564.
- Wang, T., Jonsdottir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248.
- Willett, W. C., Manson, J. E., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Rosner, B., Monson, R. R., ... & Hennekens, C. H. (1990). A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *New England journal of medicine*, 322(13), 882-889.