



***Desenvolvimento de um sumo de fruta com adição da
macroalga Gelidium corneum, recorrendo à tecnologia
HPP: caracterização físico-química, microbiológica e
sensorial***

Ana Teresa Matos Paixão Marques

Peniche, Setembro de 2015



***Desenvolvimento de um sumo de fruta com adição da
macroalga Gelidium corneum, recorrendo à tecnologia
HPP: caracterização físico-química, microbiológica e
sensorial***

Ana Teresa Matos Paixão Marques

Relatório de estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Relatório de estágio realizado sob a orientação da Professora Doutora Susana Bernardino, Professora da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, de Peniche e supervisão da Engenheira Carla Raimundo, Frubaça CRL.

Peniche, Setembro de 2015

Título: Desenvolvimento de um sumo de fruta com adição da macroalga *Gelidium corneum*, recorrendo à tecnologia HPP: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial

Copyright © Ana Teresa Matos Paixão Marques

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2015

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, 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.

Aos meus pais e irmão
À minha tia Sissi e à minha avó Elsa
À memória dos meus avós

"O homem alimenta-se de comida e imaginário; é transomnívoro"

Emílio Peres (1932-2003)

AGRADECIMENTOS

Quero expressar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. Em especial, quero agradecer:

À minha orientadora, Professora Doutora Susana Bernardino, por ter aceitado colaborar e orientar este trabalho. Pela sua disponibilidade, acompanhamento e motivação, pelas sugestões e críticas e pela amizade e carinho sempre demonstrados.

À professora Susana Mendes, pelo seu apoio no tratamento estatístico dos resultados.

À Frubaça, pela oportunidade de realizar o meu estágio nas suas instalações.

À Engenheira Carla Raimundo, por toda a disponibilidade e apoio prestados, pelas sugestões, críticas e conhecimentos transmitidos.

Às Engenheiras Sara e Vanessa, pela disponibilidade, colaboração e apoio prestados e à estagiária e colega Fabiana (esteja onde estiver), pelo apoio e companheirismo.

A todos os funcionários da Frubaça, pelo carinho com que sempre me acolheram.

À empresa Companhia das Algas Atlânticas, pela disponibilidade que demonstrou na colaboração e cedência das algas e às pessoas que contactei em de São Martinho do Porto, pela simpatia e disponibilidade demonstradas.

À Susete Pinteus, pela sua dedicação e apoio constantes, pelos conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho e pela paciência com que sempre respondeu às minhas dúvidas e questões.

Ao Sidónio, por toda a ajuda prestada a nível laboratorial, pela amizade e dedicação.

Ao Celso e à Joana, por me terem dado alojamento sempre que dele necessitei.

A todos os restantes colegas do Gabinete de Investigação em Recursos Marinhos (GIRM) do IPL, por me terem recebido prontamente no seu gabinete, por toda a sua disponibilidade, apoio e boa disposição.

Aos meus pais, irmão, avó Elsa, tia Sissi e restantes familiares, que sempre estiveram presentes e me apoiaram incondicionalmente.

Ao Luís por todo o apoio, dedicação e enorme companheirismo demonstrados.

RESUMO

No setor alimentar, o controlo da qualidade dos produtos e dos processos é uma etapa essencial, uma vez que é por este meio que se avaliam os padrões exigidos, quer a nível de legislação, quer a nível de mercado.

O presente trabalho teve, como objetivos principais, o desenvolvimento de um novo produto alimentar com adição de algas, bem como o controlo de qualidade a nível de uma unidade fabril de produção de sumos e polpas naturais, à base de hortofrutícolas.

De forma a garantir a qualidade na obtenção de produtos, foi realizado, diariamente, o controlo de entradas dos produtos hortofrutícolas, o acompanhamento de processos nas linhas de produção da fábrica e a análise das amostras de referência.

Considerando a tendência e potencial de crescimento apresentados pelo setor das bebidas, nomeadamente dos sumos de fruta naturais, juntamente com a incessante procura por ingredientes naturais ricos em vários nutrientes e com propriedades bioativas, tem-se vindo a registar o lançamento de um número considerável de bebidas inovadoras, onde as macroalgas têm merecido um papel de destaque.

Desta forma, procedeu-se à elaboração de dois protótipos, nomeadamente, sumo de framboesa e sumo de espinafres, com a adição do extrato da alga *Gelidium corneum*, estabilizados através do processo de Hiperpressão a frio, com o intuito de se avaliar o impacto desse extrato nos diferentes parâmetros de qualidade dos sumos.

No que respeita aos parâmetros físico-químicos, o pH e teor de sólidos solúveis (TSS) foram avaliados após produção (t_0), no tempo intermédio (t_{15}) e no tempo final (t_{30}). A cor foi determinada no t_0 e no t_{30} e os restantes parâmetros, como acidez titulável, quantificação total de polifenóis, capacidade de redução do radical DPPH, teor de proteína bruta, teor de cinzas, teor de minerais e oligoelementos e teor de vitaminas (A, B1, B2 e C) foram avaliados no tempo final (t_{30}). Foram, também, avaliados os parâmetros microbiológicos mais significativos, nomeadamente, microrganismos totais a 30 °C, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, bolores e leveduras (ao t_0 , t_{15} e t_{30}) e realizou-se uma avaliação sensorial ao 29.º dia após produção.

Estes sumos apresentaram-se microbiologicamente estáveis, não se tendo verificado crescimento microbiológico durante o período de armazenamento de 30 dias.

A análise dos resultados físico-químicos permitiram constatar que a adição do extrato da alga *Gelidium corneum* aos sumos influenciou as suas características, tendo havido um aumento significativo do pH com a conseqüente diminuição da acidez titulável e um aumento do teor de sólidos solúveis, em comparação com os sumos controlo. Em relação à avaliação da cor, no caso das amostras de sumos de framboesa, verificou-se que a adição do extrato de algas influenciou o parâmetro a^* . No entanto, ambas as amostras

permitiram a manutenção deste parâmetro, ao longo do tempo. Quanto ao parâmetro b^* , as duas amostras de sumo com algas demonstraram uma evolução mais estável, em relação aos respetivos controlos. No que respeita ao teor em minerais, a adição do extrato da alga demonstrou aumentar os teores de magnésio, sódio, potássio e iodo. Em termos sensoriais, o sumo de framboesa com algas obteve maior aceitação por parte do painel de provadores, podendo-se constatar que o atributo da cor foi o que mostrou maiores variações, entre as duas amostras.

Palavras-chave: Processo de Hiperpressão, sumo de framboesa, sumo de espinafres, alga *Gelidium corneum*

ABSTRACT

In the food industry quality control and shelf life studies are important to ensure the products eligibility both in terms of legislation and market standards.

The present work had, as main goals, the development of a new food product with added algae extracts, as well as, the quality control of natural fruit and vegetable juices and pulps, in a factory.

In order to ensure product quality, controls were carried out during the inbound of horticultural products, the production process was monitored and reference samples were analysed.

Considering the trend and growth potential of the drinks sector, particularly of natural fruit juices, along with the constant demand for natural ingredients rich in various nutrients and bioactive properties, a large number of innovative drinks, where macroalgae play a major role, have been recently launched.

In order to evaluate the impact of seaweed extract *Gelidium corneum* in the different quality parameters of juices, two prototypes were developed, with the addition of this extract namely, raspberry juice and juice spinach, and stabilized under high hydrostatic pressure.

Physico-chemical parameters, like, pH and content of soluble solids (TSS) were evaluated after production (t_0) at the intermediate time (t_{15}) and at the end time (t_{30}). The color was determined at t_0 and t_{30} and the other parameters such as acidity, total quantification of polyphenols, capacity to reduce DPPH radical, protein, ash, mineral and trace elements and vitamin content (A, B1, B2 and C) were evaluated at the end time (t_{30}).

The most significant microbiological parameters, like, total microorganisms 30 ° C, *Escherichia coli*, *Salmonella*, molds and yeasts were also evaluated, (at t_0 , t_{15} and t_{30}) and a sensory evaluation, was carried out, 29 days after production.

These juices had a high microbiological stability, with no change occurred in microbiological growth, during the storage period of 30 days.

The analysis of the physicochemical results demonstrated that the addition of the seaweed extract, to the juices, influenced their characteristics and there was a significant increase in pH with a consequent decrease in acidity and an increase in soluble solids compared to control samples.

Regarding instrumental color, it was found that the addition of the seaweed extract influenced a * values, however, both samples allowed to maintain this parameter over time. Both juice samples with seaweeds demonstrated a more stable development, for b^* values, as compared to respective controls. For mineral content, the addition of seaweed extract showed increasing amounts of magnesium, sodium, potassium and iodine.

Sensory analysis indicated that raspberry juice with seaweed extract obtained greater acceptance by the taste panel, and instrumental color was the attribute that showed the widest variations between the two samples.

Keywords: High Hydrostatic Pressure, raspberry juice, spinach juice, *Gelidium corneum* seaweed

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xix
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Caracterização da empresa.....	1
1.2. Aspetos de mercado.....	4
1.3. A maçã de Alcobaça.....	5
1.3.1. Características nutricionais da maçã de Alcobaça.....	6
1.4. A Tecnologia de Hiperpressão (HPP) no processamento e conservação alimentar.....	7
1.4.1. Descrição do processo.....	9
1.4.2. Vantagens e desvantagens da Tecnologia HPP.....	13
1.4.3. Efeitos da Tecnologia de HPP nos parâmetros globais de qualidade dos sumos de fruta.....	14
1.5. Tarefas desenvolvidas no âmbito do estágio.....	16
1.5.1. Controlo de qualidade nas linhas de produção da empresa Frubaça Crl.....	16
1.5.1.1. Controlo de entradas dos produtos hortofrutícolas	16
1.5.1.2. Acompanhamento de processos nas linhas de produção....	17
1.5.1.3. Análise das amostras de referência.....	17
1.5.2. Desenvolvimento de novos produtos.....	18
1.5.3. Realização de outras tarefas.....	19
1.5.4. Desenvolvimento de um novo produto – Adição de algas marinhas em sumos naturais.....	19

1.5.5. Algas: definição, ocorrência e características gerais.....	21
1.5.5.1. As algas na indústria alimentar.....	24
1.5.5.2. Valor nutricional das algas.....	26
2. ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
2.1. Enquadramento.....	29
2.2. Objetivos gerais.....	29
2.2.1. Objetivos específicos.....	29
2.3. Desenho experimental.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Recolha e preparação das amostras da alga <i>Gelidium corneum</i>	33
3.2. Avaliação química aos seguintes parâmetros das algas utilizadas no estudo:.....	33
3.2.1. Teor de cinzas.....	33
3.2.2. Teor de fibra alimentar total.....	34
3.2.3. Teor de cloretos.....	35
3.3. Otimização da produção de extratos de algas.....	35
3.3.1. Preparação dos extratos das amostras das algas.....	35
3.3.2. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante.....	36
3.3.2.1. Quantificação total de polifenóis.....	37
3.3.2.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH.....	38
3.4. Desenvolvimento de sumos naturais com adição de algas.....	39
3.4.1. Ensaio preliminares.....	39
3.4.2. Matérias-primas.....	40
3.4.3. Formulação de protótipos.....	41
3.4.4. Processo de fabrico.....	42
3.5. Análises físico-químicas dos produtos finais.....	46
3.5.1. Determinação do pH.....	46
3.5.2. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (°Brix).....	46

3.5.3. Determinação da acidez titulável.....	46
3.5.4. Determinação da cor.....	46
3.5.5. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH.....	47
3.5.6. Determinação da proteína bruta.....	47
3.5.7. Teor de minerais e oligoelementos.....	48
3.5.8. Teor de vitaminas.....	48
3.6. Análises microbiológicas.....	48
3.7. Análise sensorial.....	49
3.8. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Recolha e preparação das amostras da alga <i>Gelidium corneum</i>	51
4.2. Otimização da produção dos extratos de algas.....	51
4.3. Caracterização físico-química das amostras finais.....	53
4.3.1. Valores de pH.....	53
4.3.2. Valores de Teor de Sólidos Solúveis (°Brix).....	54
4.3.3. Valores de acidez titulável	55
4.3.4. Cor	55
4.3.5. Capacidade de redução do radical DPPH.....	58
4.3.6. Determinação da proteína bruta.....	59
4.3.7. Teor de minerais, oligoelementos e metais pesados.....	60
4.3.8. Teor de vitaminas.....	62
4.4. Análises microbiológicas.....	64
4.5. Análise sensorial.....	65
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7. ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Organigrama da estrutura organizacional na empresa Frubaça Crl.....	2
Figura 1.2 - Evolução do consumo de sumos de fruta em Portugal (Probeb, 2014)..	5
Figura 1.3 - Utilização do processamento a altas pressões em diferentes segmentos da indústria alimentar. Adaptado de: Heinz & Buckow, 2010.....	9
Figura 1.4 - Sistema de processamento de alta pressão típico para o tratamento de alimentos pré-embalados (Chawla et al, 2011).....	10
Figura 1.5 - Esquema de funcionamento de uma unidade de HPP. (http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure).....	11
Figura 1.6 – Máquina de Hiperpressão com orientação horizontal (A) e com orientação vertical (B) (http://www.avure-hpp-foods.com).....	11
Figura 1.7 – Custo por litro em função do tempo de exposição a diferentes pressões. (Enrique <i>et al.</i> , 2007).....	12
Figura 1.8 – Evolução dos custos operativos do processo HPP, por ciclo, ao longo dos anos. (Adaptado de: Bala, 2008).....	12
Figura 1.9 - Análises laboratoriais das amostras de referência.....	18
Figura 1.10 – Diferentes espécies de microalgas fitoplanctónicas. (Jahn & Kusber, 2002).....	21
Figura 1.11 – Da esquerda para a direita: <i>Palmaria palmata</i> (alga vermelha); <i>Saccorhiza polyschides</i> (alga castanha); <i>Ulva rígida</i> (alga verde). (The Seaweed Site: information on marine algae, 2000-2015).....	22
Figura 1.12 – Alga <i>Gelidium corneum</i> , apanhada na praia de São Martinho do Porto. (Companhia das Algas Atlânticas, 2014).....	24
Figura 1.13 – Apanha e secagem de <i>Gelidium corneum</i> na costa portuguesa. (Companhia das Algas Atlânticas, 2014).....	25
Figura 3.1 - Baía de São Martinho do Porto. (http://www.skyscrapercity.com).....	33
Figura 3.2 – Preparação dos extratos das amostras de algas. (Fotografias de Ana Teresa Marques).....	36
Figura 3.3 – A: Solução de DPPH; B: Microplaca de 96 poços com a adição das diferentes amostras ao DPPH e respetivos brancos (últimos 3 poços de cada	39

coluna). (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	
Figura 3.4 – Formulações testadas com diferentes percentagens de diversas matérias-primas (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	39
Figura 3.5 – Lavagem das maçãs em água hiperclorada (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	43
Figura 3.6 – Prensa pneumática de esteira contínua (belt press) (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	43
Fig. 3.7 – Máquina de enchimento e capsulagem (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	44
Fig. 3.8 – Detetor de metais (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	44
Figura 3.9 – Da esquerda para a direita: Amostras de sumo de framboesa com algas (sf_a) e sumo de framboesa controlo (sf_c) seguidas de sumo de espinafres controlo (se_c) sumo de espinafres com alga (se_a). (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	44
Figura 3.10 - Diagrama de produção dos sumos de framboesa (A) e de espinafres (B) com adição da alga <i>Gelidium corneum</i> (os sumos controlo não tiveram adição da alga).....	45
Figura 3.11 - Etapa da digestão, realizada num digestor de Kjeldahl a altas temperaturas (400°C). (Fotografia de Ana Teresa Marques).....	48
Figura 4.1 - Quantidade Total de Polifenóis (QTP) em mg EAG/g para os diferentes extratos da alga. Os valores correspondem à média ± Erro padrão da média (SEM) (n=3).....	52
Figura 4.2 - Capacidade de redução do radical DPPH por parte dos diferentes extratos da alga.....	52
Figura 4.3 - Valores médios (±DP) do pH das amostras finais, para as amostras de sumo de framboesa (a) e de espinafres (b), ao longo do tempo de armazenamento.....	53
Figura 4.4 - Valores médios (±DP) do Teor de sólidos Solúveis (°Brix), para as amostras de sumo de framboesa (a) e de espinafres (b), ao longo do tempo de armazenamento.....	54
Figura 4.5 - Valores médios (±DP) de acidez titulável, para as amostras de sumo de framboesa (a) e de sumo de espinafres (b), ao t ₃₀	55

Figura 4.6 - Valores médios (\pm DP) dos parâmetros L* (a), a* (b) e b* (c), para as amostras de sumo de framboesa e de espinafres, ao longo do tempo de armazenamento.....	56
Figura 4.7 - Valores médios (\pm DP) da capacidade antioxidante para as amostras de sumo de framboesa e de sumo de espinafres, para o t ₃₀	58
Figura 4.8 – Valores médios (\pm DP) do teor de proteína das amostras de sumo de framboesa e de sumo de espinafres, para o t ₃₀	60
Figura 4.9 – Perfil Sensorial para as duas amostras, no que respeita à aceitabilidade (a) e a intensidade (b).....	65
Figura 4.10 – Grau de aceitação global das amostras para o sumo de framboesa (a) e sumo de espinafres (b).....	67
Figura 4.11 – Intenção de compra dos dois produtos.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Resumo de algumas características de qualidade de diversos sumos após o processo de HPP. Adaptado de: Rastogi <i>et al.</i> , 2007.....	15
Tabela 1.2 – Produção de agar-agar e carragenatos. Adaptado de: Vieira & Santos, 1995.....	26
Tabela 3.1 – Formulações e percentagem de ingredientes de cada um dos protótipos.....	42
Tabela 4.1 – Teor em minerais, oligoelementos e metais pesados [Ca, Na, K, Mg, Cu, Fe, Mn (mg/100ml) e I, Pb e Cd (µg/g)] das amostras de sumo de framboesa e de espinafres, para o t ₃₀	61
Tabela 4.2 - Teor vitamínico [Vitamina A (µg retinol /100 ml) e Vitamina B1, B2 e C (mg/100 ml)] presente nas amostras de sumo de framboesa e de espinafres, para o t ₃₀	63
Tabela 4.3 - Média da contagem de microrganismos totais a 30°C (UFC/g) para os dois tipos de sumo, ao longo do tempo de estudo.....	64

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CIE - Comissão Internacional da Iluminação

DOP - Denominação de Origem Protegida

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico

FC – Folin-Ciocalteu

FIPs - Campos Elétricos Pulsados

HPP- Hiperpressão

IGP - Indicação Geográfica Protegida

MPa - Megapascal

NP – Norma Portuguesa

PET – Politereftalato de Etileno

PL – Luz Pulsada

QTP – Quantidade Total de Polifenóis

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

TGI – Target Group Index

US – Ultra-sons

UV – Ultra-violeta

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da Empresa

A Frubaça, CRL é uma Cooperativa de Produtores de Fruta e Produtos Hortícolas sedeadada no Acipreste, a cerca de 6 km da cidade de Alcobaça, distrito de Leiria.

Foi fundada em 1986 e iniciou atividade em 1992 com a construção de uma Central Fruteira, que surgiu com o objetivo específico de rececionar, selecionar, embalar, conservar e comercializar os produtos hortofrutícolas produzidos pelos seus associados (Copa, 2012; Maia, 2008; Periquito, 2014; Rosa e Mira Godinho, 2013).

Esta empresa foi formalmente constituída como uma cooperativa de 25 produtores de maçãs, na região Oeste de Portugal. Desta forma, a atividade principal dos associados desta empresa está registada para fins estatísticos como “cultura de pomóideas e prunóideas”. Os fundadores da empresa são produtores de Maçã de Alcobaça certificada com Indicação Geográfica Protegida (IGP) e de Pera Rocha do Oeste certificada com Denominação de Origem Protegida (DOP), atribuída pela União Europeia e pelo Ministério da Agricultura Nacional (Rosa e Mira Godinho, 2013; Copa, 2012).

O edifício da empresa está dividido em diferentes áreas: os escritórios, a fábrica e o armazém. Este último, encontra-se dividido em três zonas distintas, sendo elas: a zona de calibração, aprovisionamento e distribuição da fruta por grosso, a zona das câmaras de refrigeração e congelação e as zonas de produção dos sumos, *smoothies* e polpas de fruta. Os processos de produção desta empresa estão certificados com o sistema HACCP e com Norma Global de Segurança Alimentar BRC (Copa, 2012; Rosa e Mira Godinho, 2013).

Em 1997, a Frubaça conseguiu duplicar a sua capacidade de armazenamento, passando de 2500 toneladas para 5000 toneladas de fruta armazenada (Maia, 2008).

Atualmente, a empresa emprega 130 pessoas, 7 delas com formação superior e tem uma área total de produção de mais de 300 hectares. Em 2013, o volume de negócios rondou os nove milhões de euros e, em 2014, estima-se que ronde os dez a doze milhões de euros, sendo que, 25% a 30% deste valor, provém das exportações (Maia, 2008; Periquito, 2014). No final de 2013, a empresa terminou um investimento de cinco milhões de euros, apoiado pelo Proder, em que se promoveu a ampliação e modernização da fábrica de sumos, introdução de áreas de congelação e obras na área social e administrativa. Esta intervenção aumentou, significativamente, a capacidade produtiva e a flexibilidade, dando condições para a empresa continuar a crescer (Silva, 2014).

Quanto ao nível organizacional, a empresa encontra-se estruturada de acordo com o organigrama apresentado na Figura 1.1.

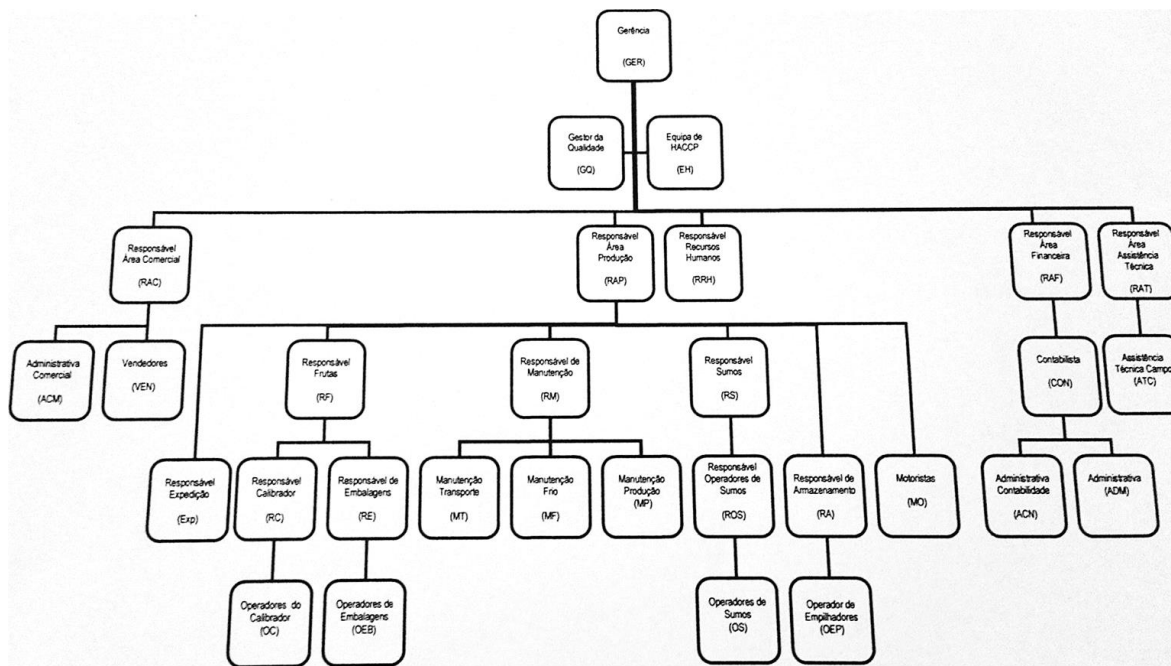


Figura 1.1 – Organograma da estrutura organizacional na empresa Frubaça Crl.

Com uma produção de cerca de 6 mil toneladas de maçã, em que 30% das mesmas são certificadas (IGP), esta é a sua principal cultura representando mais de 90% da fruta colhida. A cooperativa comercializa, também, peras e, em muito menor quantidade, ameixas, pêssegos, entre outras frutas (Rosa e Mira Godinho, 2013). É de salientar que, das seis mil toneladas armazenadas, cinco mil são em atmosfera controlada (Maia, 2008).

Uma vez que nem todas as maçãs produzidas entram nos critérios de seleção exigidos para serem colocadas no mercado em fresco, devido, sobretudo, a problemas de calibre e defeitos da epiderme, 20% a 25% do seu *stock* é canalizado para a produção de sumos processados na Unidade de Transformação, criada em 2001 (Copa, 2012; Maia, 2008; Rosa e Mira Godinho, 2013).

No que respeita ao fornecimento de outras frutas, que não são produzidas pelos sócios da cooperativa, a empresa recorre a produtores externos, onde adquire, quase exclusivamente, citrinos e frutas tropicais. Estas frutas são usadas, juntamente com as maçãs da cooperativa, na produção de sumos frescos naturais, *smoothies* (sumos com polpa) e polpas frescas de fruta que, até 2014, também contemplavam uma gama para bebés (Cipriano, 2011; Rosa e Mira Godinho, 2013). Enquanto os sumos são comercializados sob diferentes marcas, entre elas, Copa, Pingo Doce e Continente, os *smoothies* resultam de uma parceria com uma empresa de distribuição, a GL, que entra com o conhecimento específico em distribuição e marketing e a Frubaça, com a sua experiência na produção de sumos naturais (Camarinha, 2014; Simões, 2011).

Estes produtos alimentares têm a particularidade de serem feitos a partir de fruta fresca, sem sofrer qualquer tipo de tratamento térmico, adição de aditivos ou conservantes sendo, antes, estabilizados a frio, pelo processo de Hiperpressão (HPP). A Frubaça é a única empresa, em Portugal, a usar este método de conservação. (Periquito, 2014; Rosa e Mira Godinho, 2013; Simões, 2011).

Uma outra vantagem da Frubaça em relação à concorrência, prende-se com o facto desta empresa ser a produtora da matéria-prima, nomeadamente, maçãs e peras, para os seus produtos transformados, permitindo-lhe ter cem por cento de controlo sobre a qualidade dos seus géneros alimentícios. Além disso, a elaboração das polpas e dos sumos permitiram, à Frubaça, tornar-se uma empresa de desperdício zero, uma vez que, com a exceção dos produtos deteriorados, todos os outros frutos e vegetais são vendidos ou processados (Camarinha, 2014).

Metade das vendas da Frubaça são encaminhadas para as grandes superfícies, nomeadamente, para a Sonae, Pingo Doce, Jumbo e El Corte Inglés, nos quais são, geralmente, comercializados com as marcas próprias dos clientes (marcas brancas). O restante é escoado para cadeias de *fast food* nacionais de alimentação saudável, escolas e ginásios, com a marca própria da cooperativa. Esta empresa dispõe, ainda, de 15 lojas COPA, pequenos estabelecimentos de venda direta ao público, onde comercializa uma grande variedade de produtos próprios desde frutas, hortaliças, frutos secos, sumos Copa, purés Copa e *smoothies* (Cipriano, 2011; Maia, 2008; Rosa e Mira Godinho, 2013).

Em 2014, a direção estimou que se vendessem cinco milhões de litros de sumo, sendo que o volume de negócios estimado para esse ano ascendeu aos 12 milhões de euros. É de salientar que a área dos sumos representa cerca de 50% do volume de negócios da empresa (Camarinha, 2014; Rosa e Mira Godinho, 2013).

O mercado principal dos sumos é Portugal. No entanto, são exportados para Espanha, desde 2006. França e Inglaterra (o mercado de sumos mais avançado da Europa) também são clientes da empresa. O objetivo será a expansão para a Alemanha e, também, para o norte da Europa. (Camarinha, 2014; Rosa e Mira Godinho, 2013).

Paralelamente, numa parceria com a Frubaça, a empresa GL, em 2007, criou a marca Sonatural, reconhecida em Inglaterra. Dela, fazem parte os *smoothies*, uma gama de sumos com polpa de fruta. Esta parceria junta o conhecimento e a experiência da distribuição e marketing da GL, com o *know-how* dos produtores de fruta e sumos da Frubaça. Este produto é considerado um dos sumos mais puros do mundo pelo “5 a Day”, instituto britânico de sensibilização para a alimentação e saúde no Reino Unido, promovido pela National Health Service e seguindo as indicações da Organização Mundial de Saúde. É a primeira vez que este programa internacional reconhece a

existência de 2 porções de fruta (o equivalente a, no mínimo, 160 gramas) numa bebida com apenas 125 ml (COTHN, 2008; Simões, 2011).

A Frubaça foi, também, distinguida com uma menção honrosa pela Sonae, em 2010, por dispor de uma tecnologia de ponta que permite criar um produto de excelência, neste caso concreto, a polpa de fruta fresca, capaz de concorrer a nível mundial (Narciso, 2011).

A mais recente linha de sumos desta Cooperativa, os *green juices*, encontra-se à venda no mercado nacional desde março de 2014. No entanto, 70% dos sumos são exportados tendo o mercado inglês sido o primeiro a recebê-los. Desta forma, a Frubaça fornece a cadeia Whole Foods desde 2013 seguida da *Pret a Manger*, que utiliza as suas próprias marcas nos sumos, bem como embalagens exclusivas. Inglaterra, que detém o mercado de sumos mais avançado da Europa. Bélgica, França, Espanha e Inglaterra são os atuais clientes da Frubaça (Camarinha, 2014; Freitas, 2014; Periquito, 2014; Silva, 2014).

1.2 Aspetos de mercado

As diversas categorias de bebidas conquistaram o seu espaço na preferência do consumidor através de fatores como a diferenciação em relação à ocasião de consumo, oferta de conveniência, inovações de sabores, novas funcionalidades, associação à saúde, entre outros. Dentro deste contexto, os sumos destacam-se como uma das grandes categorias de bebidas, responsáveis por 14.3% do valor total gasto em bebidas, em 2006, a nível nacional (Sumos: um mercado em movimento, 2007).

De acordo com os resultados do estudo Target Group Index (TGI) Portugal, 63% dos portugueses afirmaram ter consumido sumos de fruta e/ou vegetais, nos últimos 12 meses, sendo que 13% dos consumidores os bebiam, pelo menos, uma vez por dia (Grupo Marktest, 2009).

Segundo os dados da Probeb, 2014, as bebidas refrescantes não alcoólicas têm um peso significativo, a nível nacional, no total do mercado de bebidas comerciais (4.541,9 milhões de litros), com uma representatividade de cerca de 49%.

No entanto, no decorrer da crise económica e financeira vigente em Portugal, e desde 1 de janeiro de 2012, ocorreu um agravamento da taxa de IVA para as bebidas refrescantes não alcoólicas, de 6% para 23%, que resultou numa quebra significativa no consumo destes produtos alimentares (Probeb, 2015).

Na Figura 1.2 pode observar-se que o consumo de sumos de fruta em Portugal tem vindo a decrescer ligeiramente.

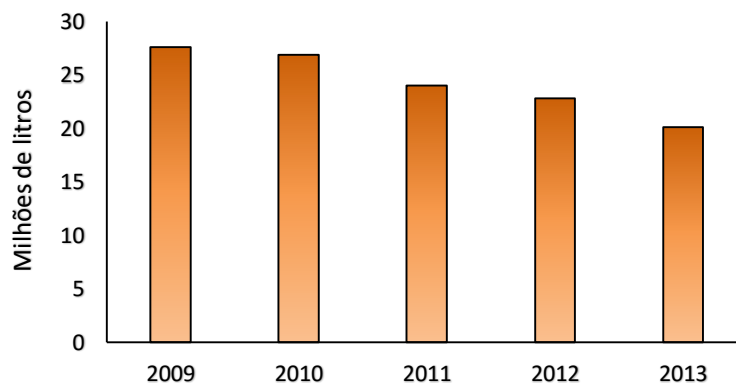


Figura 1.2 - Evolução do consumo de sumos de fruta em Portugal (Probeb, 2014).

No caso concreto da Frubaça, tem-se vindo a registar um aumento anual progressivo no volume de vendas de sumos naturais, o que reflete a preferência, da parte do consumidor, por produtos elaborados com matérias-primas de alta qualidade.

1.3 A maçã de Alcobaça

A Maçã de Alcobaça é a denominação da maçã qualificada como IGP - Indicação Geográfica Protegida, de cultivares da *Malus domestica Boekh* e a sua história remonta a 1154, quando D. Afonso Henriques doou terras, da região, aos monges de Cister para instalação do Mosteiro de Santa Maria de Alcobaça. Devido ao microclima condicionado pela localização geográfica privilegiada, entre a Serra de Candeeiros e o Oceano Atlântico, este território, desde cedo, demonstrou um enorme potencial agrícola, tendo o cultivo de árvores de fruto sido uma importante fonte de riqueza para a região (Direção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural, 2015).

De acordo com o Despacho nº 3522/2012 de 9 de março, designa-se por “Maçã de Alcobaça” os frutos dos grupos Casa Nova, Golden Delicious, Red Delicious, Gala, Fuji, Granny Smith, Jonagold, Reineta e Pink obtidos na área geográfica delimitada, que se caracteriza pelo gosto agridoce, aroma intenso, elevada consistência e crocância.

O equilíbrio entre os açúcares e os ácidos que confere às “Maçãs de Alcobaça” o aroma e sabor agridoce, que as diferencia de outras, será resultante das condições particulares de temperatura e humidade condicionadas pela proximidade do mar e a limitação natural imposta pelo sistema montanhoso Aire-Candeeiros-Montejunto que se desenvolve de norte para sul paralelamente ao oceano (Direção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural, 2015).

Atualmente, e após processo de alargamento, a área geográfica de produção abrange, para além dos iniciais concelhos de Alcobaça, Nazaré, Óbidos, Caldas das Rainha e Porto de Mós, também os concelhos da Batalha, Bombarral, Cadaval, Leiria, Lourinhã, Marinha Grande, Peniche, Rio Maior e Torres Vedras (CODIMACO, 2015).

Desta forma, a importância da maçã de Alcobaça estende-se a vários níveis sendo uma mais-valia para a economia local e nacional, uma vez que é das maçãs mais consumidas em Portugal, contribuindo para a valorização laboral, por fixar as pessoas à região e ajudar no desenvolvimento do mundo rural.

No entanto, só podem beneficiar do uso da Indicação Geográfica, as maçãs de categoria extra, I e II que, para além das características próprias da variedade, se distingam das suas similares produzidas noutras regiões, pelo sabor característico resultante das condições edafo-climáticas da respetiva região de produção (Direção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural, 2015).

Desta forma, o sistema IGP passou a limitar a quantidade de maçãs que podiam ser comercializadas, pelo facto de algumas delas não corresponderem a todos os requisitos obrigatórios, como o calibre e a categoria. Cerca de 20% a 25% da produção tinha muito pouco ou nenhum valor comercial. Foi a pensar neste excedente de produto não valorizado que os associados da cooperativa decidiram transformá-lo num produto diferenciado dos restantes, com a adoção de uma tecnologia inovadora (Maia, 2008; Rosa e Mira Godinho, 2013).

1.3.1. Características nutricionais da maçã de Alcobaça

A maçã é uma das principais frutas consumidas pela população portuguesa, em geral. É uma boa fonte de fibra, vitamina C e de inúmeros fitonutrientes com propriedades antioxidantes. Além da comprovada proteção relativamente a doenças crónicas, como o cancro e doenças cardiovasculares, há estudos que evidenciam que a interação dos seus fitonutrientes com as fibras (nomeadamente a pectina) pode trazer benefícios a nível da fermentação intestinal e do metabolismo lipídico, com a consequente redução dos níveis de colesterol plasmáticos (Almeida *et al.*, 2008; Boyer and Liu, 2004).

Cada uma das variedades deste fruto apresenta diferentes características organolépticas, aptidões culinárias e uma certa variabilidade no seu valor nutritivo e no teor em compostos benéficos para a saúde. De acordo com um estudo realizado por Almeida *et al.*, 2008, no qual foram analisadas as características das principais variedades de maçã de Alcobaça, verificou-se que estas contêm, em média, 84,5% de água, 14,9% de açúcares totais e uma porção considerável de fibras alimentares (2,1%).

O teor em proteínas é de 0,37% e o teor de lípidos não ultrapassa 0,1%. O valor energético médio é de 53 kcal/100g.

Em termos de fitonutrientes, a maçã é, sobretudo, rica em flavonoides, como por exemplo, quercetina, rutina e antocianina. No entanto, a maior parte destes compostos encontram-se, especialmente, na casca da maçã (Almeida *et al.*, 2008; Boyer and Liu, 2004). Os carotenoides são um importante grupo de antioxidantes lipossolúveis, responsáveis pela cor amarela de algumas variedades de maçã. Tal como os restantes fitonutrientes, também se encontram, maioritariamente, presentes na casca da maçã. Alguns deles podem ser convertidos em vitamina A, no organismo humano (Almeida *et al.*, 2008).

Há estudos que colocam a hipótese da maçã de Alcobaça ser mais rica em antioxidantes em relação aos outros tipos de maçã, possivelmente, devido à existência de condições edafo-climáticas que privilegiam as macieiras daquela região, permitindo-lhes obter frutos mais pequenos e com maior concentração nutricional. Desta forma, há dados que demonstram que a quantidade de flavonoides é superior em maçãs produzidas segundo práticas de Proteção Integrada em detrimento da Produção Biológica (Chinnici, 2004).

1.4 A Tecnologia de Hiperpressão (HPP) no processamento e conservação alimentar

O processamento industrial de um produto alimentar tem como objetivo prolongar o prazo de validade desse produto, mantendo as propriedades organolépticas e nutricionais o mais próximas possível dos ingredientes no seu estado natural, dando prioridade à segurança microbiológica (Oey *et al.*, 2008).

Nas últimas duas décadas, têm sido desenvolvidos novos métodos de processamento indicados para a melhoria da qualidade e segurança alimentar, de forma a responder às exigências do consumidor (Gómez, 2011).

Os consumidores optam, cada vez mais, por alimentos minimamente processados com características mais próximas às dos alimentos frescos e com redução significativa de conservantes alimentares. Neste contexto, o mercado dos sumos de fruta tem registado uma tendência crescente no que respeita ao consumo de sumos de qualidade Premium. Estes sumos são diretamente obtidos a partir de frutas e não a partir de concentrados, sendo distribuídos através de uma cadeia de refrigeração e têm uma vida útil relativamente curta (Timmermans *et al.*, 2001).

Tradicionalmente, o processamento térmico é o método mais utilizado para prolongar o prazo de validade dos alimentos líquidos, pela inativação de enzimas e

microrganismos. No entanto, a utilização de altas temperaturas tem um impacto negativo sobre a qualidade dos sumos de fruta, com perda de compostos nutricionais, propriedades antioxidantes e alterações físico-químicas indesejáveis (Bull, 2004; Oms-Oliu *et al.*, 2012; Sampedro *et al.*, 2010).

Com o objetivo de colmatar esta limitação, têm sido desenvolvidos e aplicados novos métodos alternativos ao processamento térmico. Estes métodos não térmicos têm sido referidos como uma boa opção para a obtenção de produtos alimentares com uma aparência fresca, preservando o seu conteúdo nutricional e organolético e inativando a carga microbiana (Sampedro *et al.*, 2010; Zulueta *et al.*, 2012).

Existem diversas técnicas emergentes para a obtenção de novos produtos à base de fruta, nomeadamente, as altas pressões hidrostáticas (HPP), campos elétricos pulsados (FIPs), ultra-sons (US), luz pulsada (PL), luz ultra-violeta (UV) e agentes antimicrobianos naturais, entre outros (Gómez, 2011).

De todas estas técnicas, o HPP tem vindo a ganhar um lugar de destaque na indústria dos frutos, devido à sua capacidade de destruir microrganismos e de reduzir significativamente a atividade enzimática em sumos de frutas ácidas e frutas frescas. Por outro lado, este processo, mantém praticamente inalteradas as características sensoriais dos alimentos como a cor, o aroma e o sabor, bem como as suas qualidades nutricionais, tais como, o teor em vitaminas, pigmentos e atividade antioxidante, pelo facto das suas ligações covalentes não serem rompidas a pressões inferiores a 2000 MPa (Gómez, 2011; Heinz & Buckow, 2010; Oey *et al.*, 2008, Sampedro *et al.*, 2010).

O processo de HPP foi descoberto, em 1899, pelo químico norte-americano Bert Homes Hite que investigou as aplicações da alta pressão como método para conservar o leite, alargando o estudo à conservação de frutas e vegetais (Rosa e Mira Godinho, 2013, Tao *et al.*, 2014).

No entanto, os primeiros produtos alimentares a serem sujeitos a este método de tratamento, nomeadamente geleias, doces de fruta, arroz e salsichas embaladas e processadas sem a aplicação de calor surgiram, apenas, em 1990, no Japão. (Rastogi *et al.*, 2007). Desde 1996 que o processamento de alimentos a altas pressões e consequente refrigeração é uma prática utilizada nos EUA, particularmente para o guacamole e para as ostras e, desde 2001, na União Europeia, nomeadamente, em França e Portugal, onde são processados sumos de laranja e maçã (Figura 1.3) (Health Canada's Food Directorate, 2014; Heinz & Buckow, 2010; NERSANT – Associação empresarial do Ribatejo, 2011; Rastogi, *et al.*, 2007; Rosa e Mira Godinho, 2013; Urrutia Benet, 2005).



Figura 1.3 - Utilização do processamento a altas pressões em diferentes segmentos da indústria alimentar. Adaptado de: Heinz & Buckow, 2010.

1.4.1 Descrição do processo

A tecnologia de hiperpressão (HPP) é uma tecnologia emergente de conservação e esterilização de produtos alimentares. Consiste na aplicação uniforme de pressões hidrostáticas nos alimentos, que normalmente variam entre 300 e 700 MPa (MPa = 9,869 atm = 10bar), durante um certo período de tempo, podendo variar entre trinta segundos a poucos minutos, a baixas temperaturas, que oscilam entre os - 20° C e os 80° C, consoante o equipamento usado. Estas pressões são equivalentes a 6000 vezes a pressão atmosférica normal, sendo que, pressões acima dos 400 MPa são eficazes na inativação de leveduras, fungos e na maioria das células vegetativas de bactérias, incluindo a maioria dos agentes patogénicos infecciosos presentes nos alimentos. A alta pressão causa a rutura da membrana celular dos microrganismos e altera a estrutura das enzimas, ocasionando a sua destruição e desnaturação. (Chawla, *et al.*, 2010; Heinz & Buckow, 2010; Rosa e Mira Godinho, 2013; Timmermans *et al.*, 2011).

O processo tem, por base, dois princípios fundamentais da física:

- ❖ O princípio de *Le Chatelier* que descreve que qualquer fenómeno (transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química) acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão. O aumento de pressão favorece os fenómenos que provocam a diminuição do volume, deslocando o equilíbrio na direção do sistema de menor volume (Rastogi *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2014).
- ❖ A teoria de Pascal ou princípio isostático define que a pressão é transmitida de forma uniforme e quase instantânea, independentemente do tamanho, geometria e composição do alimento (Norton and Sun, 2008; Urrutia Benet, 2005; Tao *et al.*, 2014).

O processo de hiperpressão é baseado em três parâmetros, nomeadamente, temperatura T , pressão p e tempo de exposição t . Quando comparado com outros métodos de conservação, como a pasteurização, que apenas utiliza o binómio tempo/temperatura, o HPP oferece uma ampla variabilidade de combinações a testar (Heinz & Buckow, 2010). Deve ter-se em conta o efeito termodinâmico do calor adiabático de compressão que ocorre durante a compressão e a descompressão dos alimentos tratados e o meio de transmissão de pressão. O aquecimento que ocorre durante a compressão e o arrefecimento durante a descompressão podem ser descritos em função das propriedades termofísicas do produto compressível (Knorr *et al.*, 2011).

No que respeita ao equipamento, os principais componentes de um sistema de alta pressão consistem na câmara de pressão, no sistema de pressurização e em componentes auxiliares (Figura 1.4) (Chawla *et al.*, 2011; Urrutia Benet, 2005).

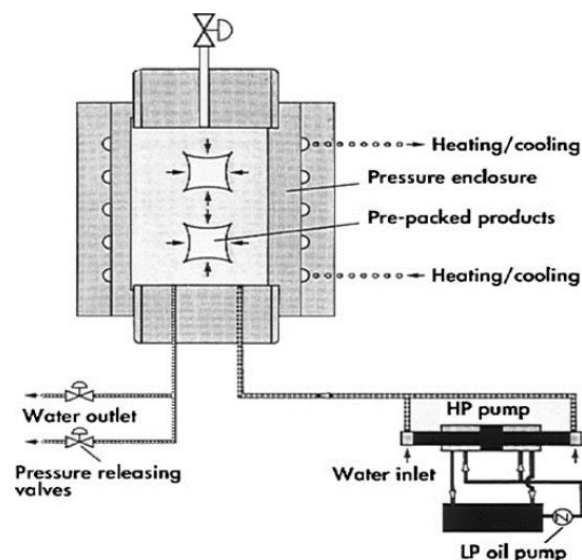


Figura 1.4 - Sistema de processamento de alta pressão típico para o tratamento de alimentos pré-embalados (Chawla *et al.*, 2011).

Neste caso, a água é utilizada como meio de transmissão da pressão, sendo bombeada, através de um intensificador, para a câmara de pressão. O intensificador consiste numa bomba de alta pressão, localizada fora da câmara de alta pressão usada para aumentar a pressão para níveis desejados. Este sistema requer tubagens de alta pressão e acessórios apropriados, de forma a poderem transmitir o meio de pressurização à câmara de alta pressão (Chawla *et al.*, 2011; Urrutia Benet, 2005).

Os sumos engarrafados são inseridos numa câmara de alta pressão cheia com água. De seguida, a câmara é pressurizada, gradualmente, até atingir o equivalente a cinco vezes a pressão do local mais profundo do oceano. A pressão é aplicada, uniformemente, em todas as direções e, em simultâneo, durante três a cinco minutos

após os quais tem lugar uma rápida despressurização. No final, as embalagens de sumo são removidas da câmara, estando prontas para a comercialização (Figura 1.5) (Cipriano, 2011; Copa, 2012; Hogan *et al.*, 2005; Maia, 2008; NERSANT – Associação empresarial do Ribatejo, 2011; Rosa e Mira Godinho, 2013).

A cooperativa foi a primeira empresa portuguesa, e uma das primeiras da Europa, a utilizar a hiperpressão (HPP) e a pioneira a produzir e comercializar sumos frescos de maçã com esta tecnologia (Cipriano, 2011; Rosa e Mira Godinho, 2013).

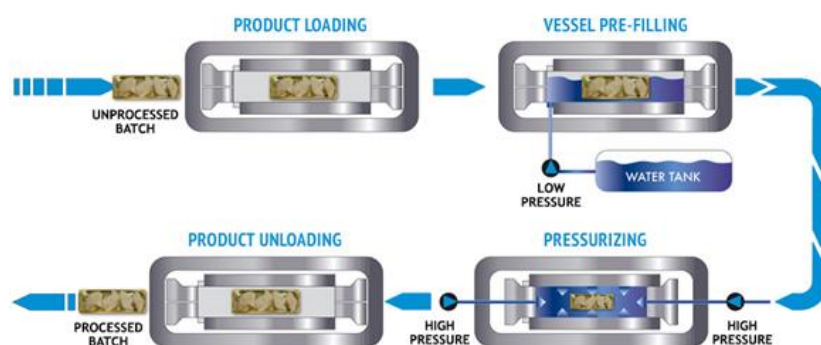


Figura 1.5 - Esquema de funcionamento de uma unidade de HPP. (<http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure>).

Esta empresa possui duas máquinas de hiperpressão, uma com orientação horizontal que apresenta um fluxo *in-line* do produto, com volume de câmara correspondente a 100 litros e uma segunda máquina, com orientação vertical e um volume de câmara de 200 litros (Figura 1.6).



Figura 1.6 – Máquina de Hiperpressão com orientação horizontal (A) e com orientação vertical (B) (<http://www.avure-hpp-foods.com>)

Os sistemas comerciais de alta pressão automatizam todas essas operações para minimizar custos e maximizar eficiência. Estes custos de processamento podem variar consoante as pressões e o tempo de exposição a essas pressões (Figura 1.7).

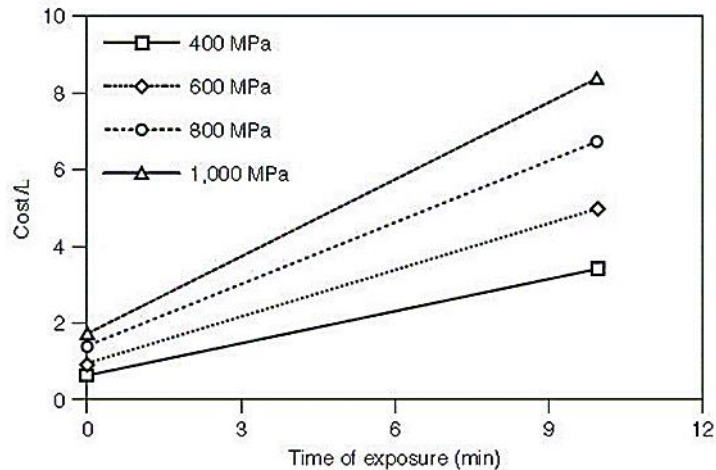


Figura 1.7 – Custo, por litro, em função do tempo de exposição a diferentes pressões. (Enrique *et al.*, 2007).

As inovações em *design* de equipamento e a adaptação industrial generalizada estão a fazer diminuir os custos da tecnologia de alta pressão operacional. Atualmente, os custos de tratamento pelo processo HPP já não apresentam uma ordem de grandeza tão superior aos custos relativos ao tratamento térmico (Figura 1.8) (Bala, 2008).

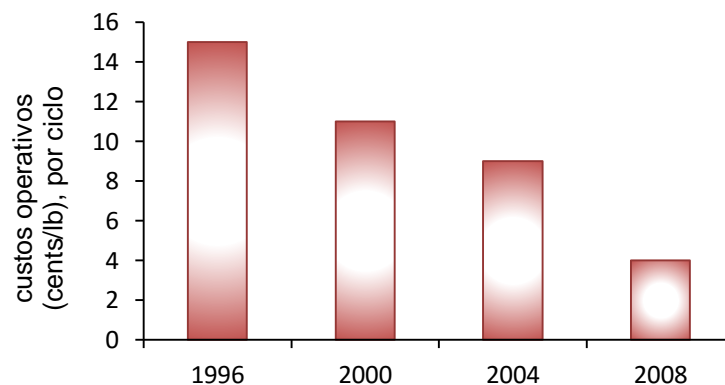


Figura 1.8 – Evolução dos custos operativos do processo HPP, por ciclo, ao longo dos anos. (Adaptado de: Bala, 2008).

1.4.2. Vantagens e desvantagens da Tecnologia HPP

Este sistema pode ser utilizado para processar, tanto alimentos líquidos, como alimentos sólidos (contendo água), para além de adicionar diversas vantagens aos alimentos, nomeadamente destruir as bactérias em alimentos crus, estabilizar o sumo sem recorrer à pasteurização ou à adição de conservantes químicos, aumentando o seu tempo de vida útil, (que, consoante o tipo de produto, pode ir de 30 a 65 dias) e incrementar determinadas características sensoriais desejadas nos alimentos (textura e digestibilidade) (NERSANT – Associação empresarial do Ribatejo, 2011; Maia, 2008).

Com a utilização da tecnologia de alta pressão é possível manter, praticamente intactas, todas as características organoléticas do produto alimentar submetido a tratamento, tais como a cor, o odor e sabor, a par com os seus valores nutritivos (Chawla *et al.*, 2010; Cipriano, 2011; Rosa e Mira Godinho, 2013; Tao *et al.*, 2014; Timmermans *et al.*, 2011).

Uma das principais vantagens deste processo prende-se com a transmissão da pressão para o produto que é realizada de forma quase instantânea e isostática, independentemente do tamanho, forma e composição dos alimentos, obtendo-se produtos altamente homogéneos (Deliza, 2005).

Além da conservação dos alimentos, a Tecnologia de HPP pode resultar na aquisição de novas texturas e estruturas por parte da matriz alimentar, e, portanto, pode ser utilizados para desenvolver novos produtos ou aumentar a funcionalidade de certos ingredientes (Rastogi *et al.*, 2007).

No entanto, numa matriz alimentar complexa, formada por uma mistura de produtos alimentares de origem vegetal, onde os compostos sensoriais coexistem com iões metálicos e enzimas, entre outros, o processamento de alta pressão pode levar a diversas mudanças indesejáveis como, por exemplo, reações catalizadas por enzimas e modificação de biopolímeros, incluindo desnaturações proteicas e formação de géis.

Este método apresenta limitações, nomeadamente para produtos alimentares com baixa acidez, uma vez que a inativação de esporos bacterianos requer pressões de, pelo menos, 800-1700 MPa, à temperatura ambiente, valores estes que excedem claramente o que é comercialmente viável (Barbosa-Cánovas and Juliano, 2008; Chawla *et al.*, 2010; Oms-Oliu *et al.*, 2012). Uma outra desvantagem prende-se com a inativação incompleta de enzimas endógenas que levam a reações de oxidação durante o armazenamento dos produtos alimentares (Oey *et al.*, 2008).

Como todos os outros processos de conservação de alimentos, o processo de HPP é específico para cada produto, tornando a extensão do prazo de validade dependente da

composição do alimento em causa, da presença de enzimas e das espécies bacterianas presentes numa determinada fábrica alimentar (Barbosa-Cánovas and Juliano, 2008).

1.4.3. Efeitos da Tecnologia de HPP nos parâmetros globais de qualidade dos sumos de fruta

Os principais parâmetros apontados como fatores de qualidade dos sumos de fruta são a cor, o grau de turbidez e o valor nutricional. No que respeita aos parâmetros nutricionais, destacam-se as antocianinas em sumos vermelhos e roxos e o conteúdo em vitamina C (Valdramidis *et al.*, 2009).

Na maioria dos casos, os parâmetros de qualidade dos produtos alimentares são negativamente afetados pelo processamento a que são sujeitos. A tecnologia de HHP em sumos de fruta, como processo alternativo de conservação, é normalmente realizado a pressões iguais ou superiores a 400 MPa, durante alguns minutos, a uma temperatura inferior ou igual a 20 °C (Patterson, 2005). O desafio mais importante, nesta área, é a manutenção das propriedades funcionais e da qualidade sensorial e nutricional, salvaguardando a segurança e o período de vida útil do produto (Gómez *et al.*, 2011).

Alguns resultados da utilização da hiperpressão em sumos estão sumarizados na Tabela 1.1.

Um dos atributos mais importantes na preferência e na decisão da escolha do consumidor, por sumos de fruta e vegetais, é a cor. Este parâmetro tem sido utilizado em diversos estudos como um indicador da qualidade nutricional e organoléptica durante o processamento/conservação e subsequente armazenamento dos produtos alimentares, visto estar associado à perceção de algumas características que parecem ter grande representatividade na qualidade dos sumos processados (Barba *et al.*, 2012).

Dos diversos fatores que causam o escurecimento da fruta, após o seu processamento, destacam-se o escurecimento enzimático dos compostos fenólicos, a oxidação do ácido ascórbico, as caramelizações, a formação de polímeros castanhos/vermelhos provocados pela oxidação lipídica e as reações de Maillard (Valdramidis *et al.*, 2009).

O processo de HHP pode influenciar a cor dos sumos de fruta, estando fortemente associado à temperatura de processamento e ao produto (Barba *et al.*, 2012).

Embora a tecnologia HPP tenha um efeito limitado sobre os pigmentos responsáveis pela coloração dos sumos, diversos estudos têm demonstrado uma alteração da cor dos sumos durante o armazenamento, devido a uma incompleta inativação enzimática (Valdramidis *et al.*, 2009).

Tabela 1.1 - Resumo de algumas características de qualidade de diversos sumos após o processo de HPP. Adaptado de: Rastogi *et al.*, 2007.

Produto	Condições de tratamento	Resultados	Referências
Sumo de maçã	400 MPa/ 10 min	Qualidade sensorial superior nas amostras de sumo sujeitas a congelação (-17 °C) seguidas de sumo pressurizado e, por último, de sumo sujeito a pasteurização (80 °C, 20 min).	Novotna <i>et al.</i> , 1999
Sumo de limão	450 MPa/ 2, 5-10 min	Ausência de fungos na amostra tratada por HPP, enquanto a amostra de controlo foi deteriorada por leveduras e fungos filamentosos, após 10 dias.	Donsi <i>et al.</i> , 1998
Sumo de morango	200–500 MPa	Sem grandes mudanças nos perfis de aroma de morango, enquanto uma pressão de 800 MPa induziu alterações significativas no perfil de aroma, formando novos compostos.	Lambert <i>et al.</i> , 1999
Sumo de laranja	500 MPa/ 1.5 min	Qualidade microbiológica do sumo com HPP semelhante ao pasteurizado termicamente (abaixo dos limites detetáveis). Armazenamento até 16 semanas sob refrigeração com aumento da retenção de sabor.	Parish, 1998
Atividade antimutagénica em sumos de fruta e vegetais	400-800 MPa/ 25-50 °C/ 10 min	Antimutagenicidade do morango e toranja não foi afetada pelos tratamentos com calor e pressão. Antimutagenicidade de sumos de cenoura, espinafres e couve-flor foi sensível ao tratamento térmico mas não à pressão.	Qiu <i>et al.</i> , 2006

Neste aspeto, os polifenóis estão particularmente envolvidos nas características de qualidade das frutas e seus produtos processados, influenciando a sua textura, a cor (principalmente as antocianinas), o sabor, nomeadamente, o amargo e o adstringente, bem como a suscetibilidade ao escurecimento (Duda-Chodak *et al.*, 2010).

Existem evidências científicas de como o processo de alta pressão pode aumentar o teor de polifenóis em sumos de maçã em comparação com o sumo fresco (Baron *et al.*, 2006). No entanto, obtiveram-se melhores resultados para o sumo pasteurizado seguido do sumo sujeito a altas pressões. Estes resultados foram explicados com base no grau de inativação da polifenoloxidase (PPO) que foi total, no caso do sumo pasteurizado, e

parcial, no caso do sumo tratado por altas pressões. De acordo com estes dados, pode-se afirmar que a PPO é uma das principais responsáveis pelas perdas de propriedades funcionais durante a produção e conservação dos sumos de fruta.

Neste âmbito, Buckow *et al.*, 2009 citado por Rastogi, 2013, desenvolveram um modelo polinomial que demonstrou efeitos sinérgicos da pressão e da temperatura sobre a inativação da PPO na maçã a pressões superiores a 300 MPa e efeitos antagonistas a pressões mais baixas.

Husband *et al.*, 2011 citado por Rastogi, 2013, verificaram que a combinação de alta pressão e processamento térmico reduz, de forma eficaz, a alergenicidade em maçãs. Todos estes resultados revelam a multiplicidade de atuações da Tecnologia HPP, que contribuem, maioritariamente, para a manutenção da qualidade dos produtos hortofrutícolas.

1.5. Tarefas desenvolvidas no âmbito do estágio

1.5.1 Controlo de qualidade nas linhas de produção da empresa Frubaça Crl.

Durante os 9 meses de estágio, tive oportunidade de ajudar no acompanhamento do controlo de processo e controlo de qualidade de todos os produtos produzidos na fábrica, enquanto desenvolvia novas fórmulas de sumos com adição de algas.

Os sistemas de qualidade na indústria alimentar têm diversas funções que vão desde a gestão documental até ao controlo dos processos. Estes sistemas englobam um conjunto de atividades, que garantem o desenvolvimento e comercialização dos produtos, de acordo com os requisitos legislativos, requisitos de clientes e dos consumidores, de forma a obter um produto final com as características esperadas.

1.5.1.1. Controlo de entradas dos produtos hortofrutícolas

Aquando da receção, cada matéria-prima é identificada, registando-se de imediato, o seu lote na respetiva nota de encomenda. De seguida, cada matéria-prima é controlada de acordo com as suas especificações. Inicialmente, existe uma inspeção das temperaturas referentes aos produtos refrigerados (em que a temperatura terá que ser inferior a 8 °C) e aos produtos congelados (onde a temperatura não poderá superar os - 18 °C). Estes são, também, sujeitos a uma inspeção visual, de forma a poder-se verificar se estão próprios para consumo e/ou armazenamento. Caso apresentem um número de produtos deteriorados superior ao limite máximo admitido, são devolvidos ao fornecedor.

Todas as amostras de frutas e vegetais vão, inicialmente, para o laboratório da fábrica, onde são determinados o pH e o teor de sólidos solúveis (TSS), expresso em °Brix, de cada uma delas. Todos estes dados são anotados em fichas próprias e arquivados, corretamente, de acordo com os procedimentos da empresa.

No que respeita à receção de citrinos, nomeadamente, limões, laranjas e limas, para além dos procedimentos anteriormente referidos, é retirada uma amostra inicial e é levada para o laboratório da fábrica. Em seguida, regista-se o seu peso e espreme-se o conteúdo. Por fim, pesa-se o sumo obtido para, depois, se calcular o rendimento do respetivo lote.

1.5.1.2 Acompanhamento de processos nas linhas de produção

A Frubaça CRL apresenta 2 linhas de enchimento de sumos, de acordo com o volume das garrafas. Uma delas enche garrafas de 750 ml e a outra enche os restantes volumes (125 ml, 250 ml e 400 ml). O esquema de produção dos sumos elaborados na empresa é apresentado no Anexo I.

Existe uma outra linha onde se faz o enchimento dos purés de fruta.

Em toda a área de produção, é necessário realizar o controlo do processo no decorrer das linhas para verificar se os produtos estão a ser produzidos conforme as especificações exigidas. Os controlos são realizados diariamente, no início e no final de cada lote, onde se faz o controlo da passagem dos produtos pelo detetor de metais e a medição volumétrica do sumo. A medição dos sumos é realizada em provetas de vidro, onde se confirma se o enchimento perfaz a capacidade volumétrica esperada. São também realizadas as restantes análises físico-químicas, como o pH, TSS, cor, sabor e homogeneidade.

1.5.1.3 Análise das amostras de referência

A qualidade de um produto é avaliada segundo a perceção das características físicas e sensoriais. Por sua vez, estas características estão relacionadas com as expectativas dos clientes/consumidores em relação à segurança do produto, suas características nutricionais e as propriedades sensoriais como sabor, textura e cor/aspecto geral.

Deste modo, existem alguns parâmetros relativos aos sumos comerciais que devem ser controlados para garantir a conformidade dos produtos no que diz respeito à qualidade e segurança.

De forma a satisfazer os requisitos de qualidade e segurança alimentar, são retiradas, diariamente, duas amostras de referência de cada lote produzido para serem

analisadas, a nível sensorial, registando-se a cor, textura, sabor e homogeneidade e a nível químico, com o registo do pH e do TSS (expresso em °Brix). (Figura 1.9). Os dados obtidos são introduzidos em folha própria, denominada de ficha de produção, onde ficam, também, discriminados outros dados desse lote, entre os quais uma amostra do respetivo rótulo, a sua composição, a quantidade de cada ingrediente, a dosagem das garrafas e os parâmetros de pressão e tempo aos quais cada lote de amostras é sujeito.

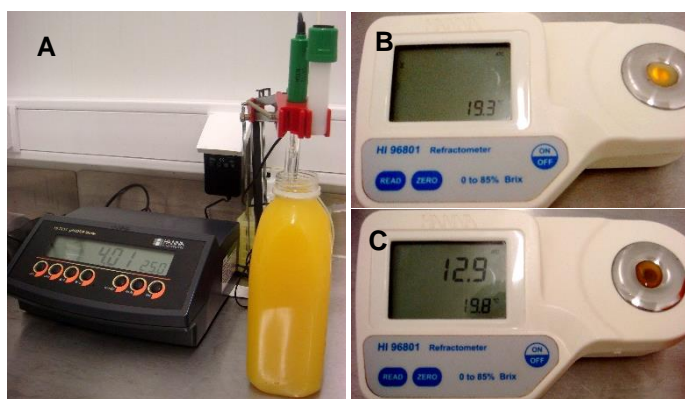


Figura 1.9 – Análises laboratoriais das amostras de referência.

A – Análise do pH; **B e C** – Análise do TSS (°Brix) das amostras de sumos.

De seguida, as amostras são reservadas na zona de produção e vão a tratamento, juntamente com as restantes amostras de referência dos lotes seguintes. Seguem, depois, para a câmara de refrigeração onde ficam armazenados em local destinado ao efeito, durante o seu tempo de vida útil. No final do prazo de validade de cada lote, é realizado novo controlo de todos os parâmetros sensoriais e químicos. Estes dados ficam armazenados em *dossier*, de forma a facilitar a rastreabilidade dos produtos.

1.5.2. Desenvolvimento de novos produtos

Durante o decorrer do estágio participei, também, no desenvolvimento de novos produtos, nomeadamente, de formulações de sumos de fruta e vegetais, de sumos com infusões, de polpas de fruta, de caldas com diferentes tipos de fruta e de diferentes formulações de gaspacho. Também se procedeu à elaboração de várias formulações de bebida de amêndoas que serviram de base para a realização de *smoothies*.

Para cada novo produto elaborado, é aberta uma ficha, na qual se descrevem todas as suas características, nomeadamente, o tipo de produto, ingredientes principais, tipo de embalagem, entre outros (de acordo com a legislação aplicável). O produto final é armazenado com a finalidade de se efetuarem diferentes testes de ensaio e tempo de prateleira.

Os testes piloto são realizados de acordo com a legislação/bibliografia. Neste âmbito, faz-se a identificação das matérias-primas, a análise e avaliação dos perigos (físicos, químicos e biológicos), a elaboração da fórmula, as alterações do processo (em case de necessidade). De seguida, é realizado um teste, utilizando um equipamento industrial “série zero”, no qual se faz uma simulação da produção industrial do novo produto. Este teste é realizado com o objetivo de se poder analisar todo o processo, desde o corte e descasque das frutas e vegetais, passando pelo trajeto ao longo do processo produtivo, até ao enchimento. Desta forma, consegue-se analisar *in loco* a eficácia e eventuais limitações no fabrico do novo produto em questão.

1.5.3. Realização de outras tarefas

Tive ainda oportunidade de ajudar na análise de legislação específica, de forma a adaptar todos os rótulos e respetivas alegações nutricionais e de saúde ao regulamento 1169/2011, aplicável a partir de 13 de Dezembro de 2014.

Também participei na realização de encomendas nacionais e internacionais, onde é necessário escolher garrafas intactas, verificar a presença dos rótulos e se todos apresentam prazos de validade adequados para a expedição, colocar prazos de validade na máquina rotuladora ou fazer etiquetas para amostras de novos produtos que, até ao momento, não tenham ainda um rótulo definido.

1.5.4. Desenvolvimento de um novo produto – Adição de algas marinhas em sumos naturais

Para dar resposta às exigências do mercado, de forma continuada, as empresas procuram desenvolver novos produtos que sejam saudáveis, de fácil transporte, preparação e consumo. Desta forma, os novos produtos fornecem um meio para que indústria alimentar se mantenha competitiva.

O sucesso das inovações depende da aceitação, por parte dos consumidores, de novos produtos e tecnologias. Neste contexto, é fundamental conhecer as suas necessidades e preferências, através de uma melhor comunicação entre os principais intervenientes no processo de inovação de alimentos (EUFIC, 2014).

Nas últimas duas décadas, o número crescente de artigos científicos que demonstram uma correlação direta entre a forma como nos alimentamos e algumas doenças crónicas, têm levado a um enorme interesse, por parte dos consumidores e da indústria alimentar, por produtos que promovem a saúde e bem-estar (Plaza *et al.*, 2008).

A crescente procura por ingredientes de origem natural em detrimento das substâncias químicas, tem contribuído para uma grande expansão da indústria dos hortofrutícolas e tem atraído o setor das bebidas para o mercado de determinados alimentos, nomeadamente, os alimentos funcionais (Gruenwald, 2009).

Graças aos resultados de diversas pesquisas que demonstram os benefícios da utilização da tecnologia HPP, as bebidas à base de frutas, sujeitas a esta tecnologia, com um preço competitivo e alta qualidade nutricional, têm vindo a registar um aumento considerável do seu consumo nos mercados mundiais, especialmente na Europa e na Austrália. Assim, é de todo o interesse o desenvolvimento de novos produtos alimentares à base de frutas e hortícolas, que possam constituir uma opção saudável.

Hoje em dia, uma das principais áreas de pesquisa em Ciência e Tecnologia de Alimentos prende-se com a extração e caracterização de novos ingredientes naturais com atividade biológica, nomeadamente, atividade antioxidante, antiviral, entre outras, que podem contribuir para o bem-estar do consumidor, como parte integrante de novos alimentos funcionais (Plaza *et al.*, 2008).

O conceito de “alimento funcional” foi criado e introduzido, primariamente, no início dos anos 80, no Japão.

Um alimento funcional é, geralmente, definido como qualquer alimento ou constituinte alimentar com eventuais benefícios na promoção da saúde e prevenção de doença, independentes da sua função energética e nutricional (Herrero *et al.*, 2005).

Existem diversos compostos que podem ser usados como potenciais ingredientes funcionais, nomeadamente, carotenoides, polifenóis, ácidos gordos polinsaturados, fibras, entre outros (Diplock *et al.*, 1999; Plaza *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, diversos estudos científicos têm demonstrado o enorme potencial das algas como fonte de componentes bioativos, sendo consideradas uma nova e ilimitada fonte de novos ingredientes para o desenvolvimento de produtos alimentares com potenciais benefícios para a saúde (Brownlee *et al.*, 2012; Cofrades, *et al.*, 2013; Plaza *et al.*, 2009). Hoje em dia, as algas já adquiriram o conceito de um novo “superalimento” (El Din and El-Sherif, 2012). Além disso, a utilização de algas é suscetível de aumentar, tendo em conta a necessidade de recursos alimentares adicionais que possam dar resposta ao crescimento populacional (Cofrades *et al.*, 2013).

Algumas organizações governamentais e comerciais em França têm vindo a promover o consumo de algas na restauração e para uso doméstico, com algum sucesso (McHugh, 2003).

Uma forma de promover a ingestão de algas será utilizá-las como um ingrediente em produtos alimentares de consumo frequente. Neste caso concreto, estas poderão ser adicionadas aos sumos naturais, processados por HPP, a fim de se tirar proveito das

suas propriedades nutricionais, funcionais e tecnológicas. (Cofrades *et al.*, 2013; Yan, 1998).

Nos últimos anos, foram publicados vários trabalhos e registadas diversas patentes, no que respeita ao fabrico de bebidas com a adição de algas, que oferecem benefícios para a saúde (Cofrades, 2013; Gruenwald, 2009; Nagai and Yukimoto, 2003).

1.5.5. Algas: definição, ocorrência e características gerais

A ficologia ou algologia é o estudo das algas. O termo ficologia deriva do grego *phycos* que significa alga marinha (Lee, 2008).

As algas constituem um grande e diversificado grupo de espécies autotróficas, isto é, produzem a energia necessária ao seu metabolismo, através da fotossíntese. Possuem, em comum, o pigmento clorofila *a*, são considerados organismos talófitos (ou seja, não são diferenciados em raízes, caules e folhas), e apresentam estruturas reprodutoras simples (Dawes, 1998; Lee, 2008). Apresentam uma ampla distribuição geográfica, colonizando diferentes meios, sempre associados à presença de água. Podem ser encontradas sobre as rochas húmidas, flutuantes na água, sobre outras plantas ou em associação com outros organismos, nomeadamente, os fungos, formando os líquenes. (Almeida, 2007; Barsanti and Gualtieri, 2006; Pereira, 2010)

As algas funcionam, na maioria dos habitats, como produtores primários na cadeia alimentar, produzindo material orgânico a partir da luz solar, dióxido de carbono e água (Lee, 2008). Incluem formas procariontes, sem uma verdadeira membrana nuclear e com os pigmentos fotossintéticos dispersos no citoplasma e formas eucariontes, com uma verdadeira membrana nuclear e realizam a fotossíntese usando organelos denominados cloroplastos. Estas classificam-se em microalgas e macroalgas, consoante as suas dimensões (Dawes, 1998). As algas não possuem características mais evoluídas das plantas como a existência de flores ou de cones nem apresentam sistemas para o transporte interno de nutrientes (Almeida, 2007).

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogéneo de organismos. Vivem em suspensão, são predominantemente aquáticas e geralmente microscópicas unicelulares, podendo formar colónias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular (Figura 1.10) (Pereira, 2010).



Figura 1.10 – Diferentes espécies de microalgas fitoplanctónicas. (Jahn & Kusber, 2002).

A classificação mais comum entre a comunidade científica divide as microalgas em dois grupos distintos consoante a sua estrutura celular. Assim, as microalgas procarióticas pertencem às Divisões Cyanophyta e Prochlorophyta, enquanto as microalgas eucarióticas são agrupadas nas Divisões: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae, entre outras), Cryptophyta e Dinophyta (Derner *et al.*, 2006).

As microalgas são planctónicas, uma vez que constituem o fitoplâncton, o qual se encontra na base da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos. O fitoplâncton constitui a principal fonte de produção de matéria orgânica na água e serve de alimento a organismos de maiores dimensões. Encontra-se, maioritariamente, em águas doces e salgada (Dawes, 1998; Tomaselli, 2004).

As macroalgas são seres eucarióticos (com uma verdadeira membrana nuclear) que realizam a fotossíntese usando organelos denominados cloroplastos. Estas apresentam uma construção multicelular e fixação firme ao substrato. Por estarem sujeitas às mais variadas condições ambientais, por vezes extremas, as algas biossintetizam diversos metabolitos secundários sendo, alguns deles, compostos ativos com propriedades benéficas para a saúde. Esta particularidade confere às algas um grande potencial para a extração de compostos bioativos ou como ingredientes em alimentos funcionais (Holdt and Kraan, 2011).

As macroalgas podem ser classificadas como algas vermelhas (Rhodophyta), castanhas (Heterokontophyta, Phaeophyceae) ou verdes (Chlorophyta), dependendo da sua composição química e conseqüentemente nutricional (Figura 1.11) (Barsanti and Gualtieri, 2006; Paiva *et al.*, 2014).



Figura 1.11 – Da esquerda para a direita: *Palmaria palmata* (alga vermelha); *Saccorhiza polyschides* (alga castanha); *Ulva rigida* (alga verde). (The Seaweed Site: information on marine algae, 2000-2015).

No caso particular das algas vermelhas, estima-se que existam entre 4000 a 6000 espécies descritas, num total superior a todos os outros grandes grupos de algas

marinhas. Apresentam um tamanho médio, entre alguns milímetros a algumas dezenas de centímetros e raramente são unicelulares. Incluem, maioritariamente, formas marinhas e as restantes, aproximadamente, duzentas espécies, são de água doce (Lee, 2008).

As algas vermelhas apresentam um tipo de amido que forma grãos citoplasmáticos (amido florídeo) e uma ausência total de células flageladas.

Os cloroplastos das algas vermelhas possuem clorofila *a* e *d*, ficobilinas, xantofilas e carotenóides, o que lhes confere tonalidades diferentes consoante a predominância relativa de cada um.

A capacidade que as algas vermelhas apresentam para viver em maiores profundidades no oceano, podendo atingir até 200 metros de profundidade, está relacionada com a função dos seus pigmentos acessórios denominados ficobilinas. São pigmentos hidrossolúveis, de coloração azul ou vermelha, presentes nas divisões Rhodophyta, Cyanobacteria e Cryptophyta. Dividem-se em ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina, e permitem ampliar a faixa de luz que pode ser utilizada na fotossíntese (Barsanti and Gualtieri, 2006; Lee, 2008; O'Carra, 1980).

A ficoeritrina é a mais abundante ficobillina nas algas vermelhas. Para além de serem utilizados como corantes naturais a nível alimentar e de cosmética, estes pigmentos também são usados como marcadores fluorescentes, aplicados em ensaios imunológicos, microscópicos e de ligação ao DNA. Simultaneamente, apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuro e hepatoprotetora, antiviral, anti tumoral, entre outras (Cardoso *et al.*, 2014; Holdt and Kraan, 2011).

As paredes celulares das algas vermelhas são constituídas por celulose e por mucilagens, nomeadamente, mananas, xilanas e galactanas, de onde se extrai o agar-agar utilizado no fabrico de gomas, laxantes e como meio de cultura para bactérias (Cardoso *et al.*, 2014; McHugh, 2003). Apresentam talos com diferentes morfologias, nomeadamente, unicelulares, filamentosos e pseudoparenquimatosos (Barsanti and Gualtieri, 2006).

Quanto à espécie abordada neste trabalho, a *Gelidium corneum*, é uma alga que pertence ao sub-reino Thallophyta, Classe Rhodophyceae (algas vermelhas), Ordem Gelidiales e família Gelidiaceae. Esta alga possui um talo cartilaginoso, extremamente duro e forte que se fixa à rocha por um sistema radicular semelhante a raízes, denominado rizóide. Estende-se a uma profundidade de 1 a 3 m, encontrando-se, muitas vezes, nas poças debaixo de outras algas. Os seus ramos apresentam dimensões entre 20 a 35 cm de comprimento (Figura 1.12) (Pereira, 2007).

No que respeita à sua distribuição, a alga *Gelidium corneum*, pode ser encontrada desde a Europa até ao Norte de África e do Mediterrâneo, bem como na Austrália, Nova Zelândia e no Caribe (Seaweed Industry Association, 2014).



Figura 1.12 – Alga *Gelidium corneum*, apanhada na praia de São Martinho do Porto. (Companhia das Algas Atlânticas, 2014).

Em Portugal, forma densas populações no patamar infralitoral da zona centro da costa portuguesa e no horizonte inferior do patamar médiolitoral da zona costeira entre Lisboa e o Algarve (Pereira, 2007).

1.5.5.1 As algas na indústria alimentar

Desde a antiguidade que as algas fazem parte da alimentação da grande maioria dos povos da Ásia Oriental. O seu uso é conhecido desde o século IV no Japão e desde o século VI na China, constituindo, atualmente, cerca de 10% da dieta dos japoneses. O volume de produção de algas aquáticas aumentou em taxas anuais médias de 9,5% em 1990 e 7,4% na década de 2000, equivalente a produções de 3,8 milhões de toneladas em 1990 e 19 milhões de toneladas em 2010 (Patarra *et al.*, 2014). De acordo com as estatísticas da FAO, a Coreia do Sul, a China e o Japão apresentam os países com os maiores níveis de consumo de algas, sendo o consumo diário de 46, 22 e 4g *per capita*, respetivamente (Mæhre *et al.*, 2014).

Ao contrário do que acontece na Ásia Oriental, o Ocidente utiliza, essencialmente, as algas marinhas como uma fonte de ficocolóides nomeadamente, carragenanas, agar e alginatos (Brownlee *et al.*, 2012). Estes compostos são formados por polissacarídeos que fazem parte das paredes celulares e espaços intercelulares de diversas algas. As carragenanas e o agar encontram-se, fundamentalmente, em algas vermelhas e os alginatos, em algas castanhas. Estes ficocolóides apresentam propriedades espessantes, gelificantes e estabilizantes, que são amplamente utilizados na indústria alimentar (Burtin, 2003; Mchugh, 2003; Pereira, 2011; Melo, 2002; Rupérez, 2002). Estes compostos também promovem a aceitação de determinados produtos alimentares pelos consumidores, bem como o alargamento do seu prazo de validade (Brownlee *et al.*, 2012).

As macroalgas marinhas são responsáveis por uma percentagem importante da produção primária no território nacional. A sua apanha e utilização foi descrita no século XIV, sendo a apanha de sargaço uma atividade que ainda é exercida no norte do país, tendo sido regulamentada em 1308 pelo rei D. Dinis (Melo, 2002; Pereira, 2007; Santos e Duarte, 1991). A apanha e utilização de algas marinhas foi constante até ao Século XX, em que a falta de agar, no Japão, deu origem ao aparecimento de uma indústria de agar português com expressão nos mercados mundiais. (Pereira, 2007).

A existência da espécie *Gelidium sesquipedale* (Clem.), hoje denominada *Gelidium corneum*, muito semelhante às agarófitas usadas no Japão, foi detetada, em Portugal, no início de 1942 e desde aí, iniciou-se o desenvolvimento de metodologia para extração laboratorial do agar. Estas algas obtiveram a designação genérica de limos e foram apanhadas da costa centro para sul, tendo como destino principal, a exportação (Melo, 2002; Pereira, 2007; Santos e Duarte, 1991). Embora seja uma espécie perene, a época mais propícia à sua apanha, na Baía de São Martinho do Porto, é entre Julho e Novembro. É de salientar que as algas desta região são, cientificamente, tidas como as melhores do país e constituem um recurso económico de interesse para a população local (Figura 1.13) (Pereira, 2007).



Figura 1.13 – Apanha e secagem de *Gelidium corneum* na costa portuguesa. (Companhia das Algas Atlânticas, 2014).

A - Embarcação usada na apanha das algas; **B** - Mergulhador semi-autónomo, dependente do compressor do barco; **C** - Saco cheio com algas é colocado num guincho e recolhido para bordo; **D** – As algas são espalhadas pelos campos para secagem rápida. (Companhia das Algas Atlânticas, 2014).

A apanha destas algas, em Portugal, é feita normalmente por mergulho, sendo esta atividade legislada desde 1967 através do Decreto nº 48 008 de 27 de Outubro (Melo, 1998; Melo, 2002).

Em 1971, Portugal tinha 6 fábricas de agar, tornando-se num dos maiores produtores mundiais deste ficocolóide, produzindo cerca de 806 toneladas por ano (Santelices, 1988).

Todavia, devido à incapacidade de diversificar, de apostar na qualidade e à situação desfavorável a nível internacional, esta indústria foi perdendo o seu poder (Tabela 1.2), restando hoje, apenas uma empresa, a Iberagar (Cardoso *et al.*, 2014; Melo, 2002; Pereira, 2007; Santos e Duarte, 1991).

Tabela 1.2 – Produção de agar-agar e carragenatos. Adaptado de: Vieira & Santos, 1995.

Nome da Empresa	Local da Atividade	Estado Atual
Ala-Ala	Hangra do Heroísmo	Encerrou a atividade
Biomar	Porto	Encerrou a atividade
Sicomol	Paião, Figueira da Foz	Encerrou a atividade
Unialgas	Setúbal	Atual Iberagar
Camelo	Alverca	Encerrou a atividade

Recentemente, algumas jovens empresas, nomeadamente, a Algaplus, a Wedotech, a Algafuel, entre outras estão a iniciar a sua atividade, a fim de explorar o potencial biotecnológico da flora marinha ibérica (Cardoso *et al.*, 2014; Pereira, 2007).

1.5.5.2 Valor nutricional das algas

A nível mundial, são usadas cerca de 221 espécies de macroalgas, 145 (66%) das quais são utilizadas diretamente na alimentação (79 rodofíceas, 38 feofíceas e 28 clorofíceas) (Pereira, 2007).

Apesar da abundância de algas na costa portuguesa, o uso destas na alimentação não tem grande tradição em Portugal, exceto para algumas comunidades costeiras nos Açores (Pereira, 2007).

No que respeita ao valor nutricional, as algas fornecem uma grande variedade de minerais, com valores cerca de dez vezes superiores ao encontrado nos vegetais terrestres, oligoelementos e diversas vitaminas. É de salientar que as algas podem ser

uma fonte importante de iodo na dieta. Este mineral exerce um papel fundamental na regulação da glândula tiróide, responsável pela manutenção do metabolismo.

As algas também são ricas em proteínas, geralmente, de alto valor biológico, por conterem todos os aminoácidos essenciais. Possuem ácidos gordos ómega-3 e polissacarídeos que se comportam, na sua grande maioria, como fibras que não são totalmente digeridas pelas enzimas intestinais humanas, o que as torna num alimento muito equilibrado a nível nutricional e com poucas calorias (Pereira, 2007; Rupérez, 2002; Dhargalkar, 2014).

A *Gelidium* pertence a um género de alga que possui um conteúdo elevado em fibras hidrossolúveis, sais minerais e oligoelementos, apresentando, desta forma, efeitos laxantes e adelgaçantes (Pereira, 2010).

É dela que se extrai o agar, um ficolóide com propriedades gelificantes, constituído por dois polissacarídeos: a agarose e a agarpectina, que devido às suas propriedades não podem ser digeridos nem assimilados pelo organismo (Pereira, 2007). A sua utilização teve origem na Ásia, onde foi consumido durante vários séculos, como alimento básico nas dietas típicas de inúmeros povos (Cardoso *et al.*, 2014; Iberagar, 2010; Mchugh, 2003).

Cerca de 90% do agar produzido globalmente é usado na indústria alimentar. O agar apresenta excelentes qualidades como espessante, estabilizante e gelificante, sendo um ingrediente fundamental na preparação de geleias, conservas de carne, gomas de fruta, pastilhas, sopas, e produtos de confeitaria, permite substituir a gordura em derivados lácteos, patês e molhos, atua como agente clarificador na produção de cervejas, vinhos e café, para além de ter um papel fundamental na regulação do trânsito intestinal (Pereira, 2007; Pereira, 2010).

As suas principais características são a ausência de sabor, cheiro e cor, são solúveis na água e são conciliáveis com a maioria dos alimentos.

Os restantes 10% são, atualmente, usados em aplicações biotecnológicas, nomeadamente, na elaboração de meios de cultura de bactérias, microalgas, tecidos, entre outros (Pereira, 2007; Pereira, 2010).

Diversos estudos realizados nas últimas décadas têm demonstrado diversas propriedades terapêuticas das algas. As suas fibras demonstraram ser eficazes na redução da obesidade, do colesterol sanguíneo, da diabetes, do cancro do cólon, entre outros (Pereira, 2010).

Auxiliam na remineralização óssea, por serem das maiores fontes vegetais de cálcio, apresentam um efeito positivo na regulação mineral do organismo e na regulação arterial, possuem atividade antioxidante, auxiliam na eliminação de radiação nuclear do organismo entre muitos outros benefícios. (El Din and El-Sherif, 2012).

2. ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL

2.1. Enquadramento

O presente trabalho surge no âmbito do estágio profissional para a conclusão do Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar ministrado na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche e resultou de uma proposta feita pela Frubaça para o desenvolvimento de um novo sumo processado por HPP, com adição de uma alga típica da região de São Martinho do Porto, concelho de Alcobaça.

Ao longo dos últimos anos, tem havido um interesse crescente pelas algas marinhas como fonte de ingredientes bioativos, com várias aplicações no processamento de alimentos mais saudáveis e fornecendo novos compostos com diversas propriedades funcionais. Contudo, as algas presentes na costa portuguesa encontram-se muito pouco exploradas e caracterizadas, havendo pouca tradição no seu consumo.

Assim sendo, este trabalho, incidiu no desenvolvimento de um produto, que tem como base, o sumo de maçã, ao qual foi adicionado um teor específico da alga *Gelidium corneum*.

2.2. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos gerais o desenvolvimento de um novo produto alimentar, englobando duas variedades de sumo à base de fruta e produtos hortícolas com a adição da macroalga *Gelidium corneum*, de forma a incrementar o seu valor nutricional, bem como, o controlo de qualidade de produtos hortofrutícolas.

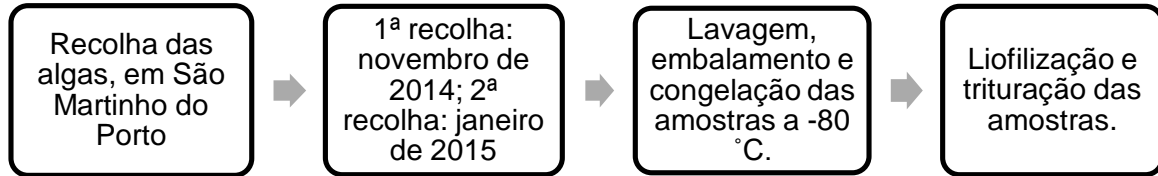
2.2.1. Objetivos específicos

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

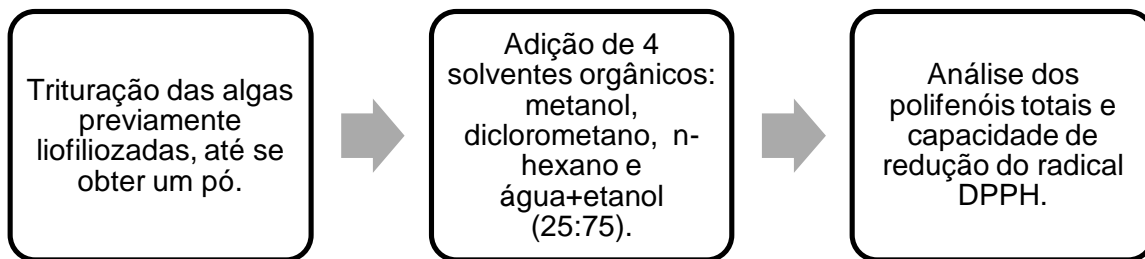
- Valorização e promoção da alga *Gelidium corneum*, como recurso marinho existente na costa portuguesa.
- Avaliação nutricional da alga *Gelidium corneum*, nomeadamente, potencial antioxidante, teor de cloretos, teor de cinzas e fibra total.
- Avaliação do efeito da adição da alga *Gelidium corneum* a duas variedades de sumo de fruta elaborados com a tecnologia HPP, nos diferentes parâmetros de qualidade, nomeadamente, nos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.
- Comparação dos parâmetros de qualidade das duas variedades de sumo com algas em relação aos sumos controlo (sem algas).

2.3. Desenho experimental

1ª Fase: Recolha e preparação das amostras da alga *Gelidium corneum*



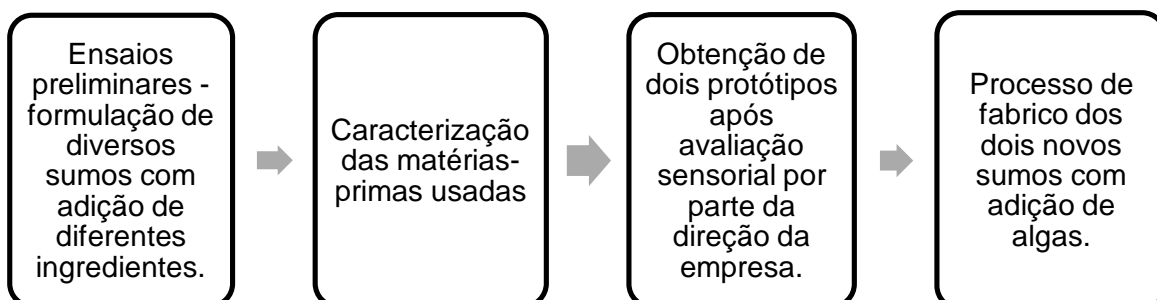
2ª Fase - Otimização da produção de extratos de algas:



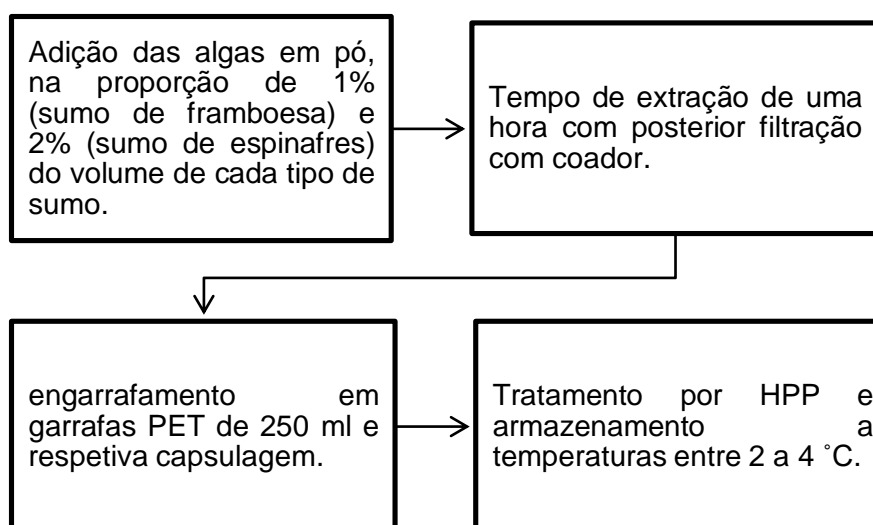
3ª Fase – Avaliação química aos seguintes parâmetros das algas utilizadas no estudo:

- Teor de Cinza
- Teor de Fibra Bruta
- Teor de Cloretos

4ª Fase – Desenvolvimento de sumos naturais com adição de algas



5ª Fase – Adição das algas aos sumos de fruta



6ª – Caracterização físico-química e microbiológica dos produtos finais (ao longo do tempo de armazenamento (1 mês))

Os novos produtos (sumo de framboesa e sumo de espinafres com adição de algas) e o produto controlo (respetivos sumos sem algas) foram alvo das seguintes análises:

Parâmetros físico - químicos	Parâmetros microbiológicos **
- pH	- Microrganismos totais a 30 °C
- Teor de Sólidos Solúveis	- Escherichia coli
- Acidez titulável*	- Salmonella spp
- Cor	- Bolores
- Quantificação total de polifenóis*	- Leveduras
- Capacidade de redução do radical DPPH*	
- Teor de proteína bruta*	
- Teor de minerais e oligoelementos*	
- Teor de vitaminas (A, B1, B2 e C) *	

7ª – Avaliação sensorial das amostras (no tempo final de produção - t₃₀)

*Estes parâmetros foram, apenas, avaliados no tempo final de produção (t₃₀)

**Todos os parâmetros microbiológicos foram avaliados ao t₀ (após produção), t₁₅ e t₃₀.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Recolha e preparação das amostras da alga *Gelidium corneum*

Numa primeira fase, foi recolhida uma amostra da alga em estudo para se proceder à sua avaliação taxonómica. A espécie foi identificada, na ESTM, por professores e investigadores em biologia marinha, com o auxílio de guias de identificação.

A recolha das algas foi realizada na Baía de São Martinho do Porto, Portugal (Figura 3.1), em novembro de 2014, por mergulhadores que usam embarcações destinadas ao efeito. Esta baía foi um dos principais portos do país até finais do século passado. Atualmente, é um importante porto de recreio e centro de recolha de algas marinhas.



Figura 3.1 – Baía de São Martinho do Porto. (<http://www.skyscrapercity.com>)

As amostras foram, posteriormente, lavadas em laboratório, com água do mar, de forma a remover organismos invertebrados, areias e detritos. Após a lavagem, as algas foram pesadas, embaladas e congeladas, durante duas horas, a -80°C (Thermo, Electron Corporation). De seguida, estas foram colocadas num liofilizador (SupplyLab, Cacém, Portugal) durante dois dias e, por fim, foram trituradas numa picadora Moulinex A320R1 de forma a obter-se um pó que foi, posteriormente, incorporado no fabrico dos sumos.

3.2. Avaliação química aos seguintes parâmetros das algas utilizadas no estudo

3.2.1. Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado segundo o método adaptado da NP 2032:1988 para determinação do teor de cinza em pescado. O teor de cinzas de um alimento é o nome

dados ao resíduo inorgânico que permanece após a carbonização da matéria orgânica, entre 525°C e 550°C, e a evaporação da água e substâncias voláteis, dando origem a CO₂, H₂O e NO₂. Desta forma, as cinzas de um alimento servem de base para a análise de minerais específicos. Para tal, pesaram-se 3g ± 0,001g de amostra de algas para cadinhos de porcelana e levou-se a secar na estufa (Memmert) a 105 ± 2°C durante a noite. Os cadinhos foram colocados no exsiccador, deixaram-se arrefecer e voltaram-se a pesar. Após este processo, os cadinhos foram transferidos para uma mufla (Nabertherm B170 Controller) ± 525°C durante 14 horas (rampa de 3 horas, e secagem de 11 horas) para que toda a matéria fique incinerada. No final, colocaram-se os cadinhos no exsiccador até verificação de peso constante. Esta técnica foi realizada em triplicado. A quantificação do teor de cinzas total recorre à seguinte fórmula:

$$\% \text{ Cinza} = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \times 100$$

Sendo que m₁ correspondente à massa inicial da cápsula (g), m₂ corresponde à massa da cápsula com amostra inicial (g) e m₃ corresponde à massa da cápsula e da cinza (g) depois da incineração.

3.2.2. Teor de fibra alimentar total

A determinação do teor de fibra alimentar total foi realizada tendo por base o método AOAC 985.29 (enzimático-gravimétrico), com o auxílio de um Kit comercial (Total Dietary Fiber, Merck) (Anexo II). Não foi necessário fazer, inicialmente, uma remoção de gordura da amostra, uma vez que esta continha um teor de gordura inferior a 5%. Numa primeira etapa, procedeu-se à hidrólise do amido através da α-amilase, na etapa seguinte, à hidrólise da proteína pela ação da protease e, por último, à hidrólise da amilose por adição da amiloglucosidase. A fibra solúvel foi precipitada com etanol 95%. O resíduo total foi filtrado e sucessivamente lavado com etanol 78%, etanol 95% e acetona. Após secagem, o resíduo foi pesado. Um dos duplicados foi usado para a determinação da proteína e o outro para a determinação da cinza. Todas as análises foram realizadas em triplicado e o teor de fibra alimentar total foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{Teor de fibra total} = \frac{m_R - m_P - m_A - m_B}{m} \times 100$$

Em que m_R corresponde à média da massa do resíduo (mg), m_P corresponde à massa de proteína no resíduo (mg), m_A corresponde à massa de cinzas no resíduo (mg),

m_B à massa do resíduo do branco (mg) e m corresponde à média da massa da amostra inicial (mg).

3.2.3. Teor de cloretos

A determinação do teor de cloretos foi realizada em conformidade com o decreto de lei 25/2005, artigo 11 anexo I. Neste método, entende-se por teor de cloretos a quantidade total de iões de cloro expressa em percentagem em massa de cloreto de sódio. Esta determinação é feita pela solubilização dos cloretos numa solução aquosa, e uma posterior precipitação por excesso de nitrato de prata (0,1N) na presença de uma solução de ácido nítrico puro. Posteriormente, procede-se uma titulação deste excesso com uma solução de tiocianato de amónio (0,1N) na presença de uma solução saturada de alúmen férrico.

O teor de cloretos da amostra é expresso em percentagem em massa de cloretos de sódio, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Teor de Cloretos} = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2) \times N}{m} \times 100$$

Onde V_1 corresponde ao volume, em centímetros cúbicos, da solução de tiocianato de amónio gasto na titulação do branco, V_2 corresponde ao volume, em centímetros cúbicos, da solução de tiocianato de amónio gasto na titulação da amostra, m corresponde à massa inicial, em gramas, da amostra analisada e N à concentração, expressa em normalidade, da solução de tiocianato de amónio.

3.3. Otimização da produção de extratos de algas

3.3.1. Preparação dos extratos das amostras das algas

O método de preparação dos diferentes extratos de algas foi adaptado a partir do trabalho realizado por Pinteus, 2011.

As algas, previamente congeladas e liofilizadas, foram trituradas, obtendo-se um pó ao qual se adicionaram solventes orgânicos de diferentes polaridades, nomeadamente metanol, diclorometano, n-hexano e água:etanol (25:75). Pesou-se 5g do pó obtido a partir da trituração da alga *Gelidium corneum* e colocou-se, em agitação num gobelé, com 300 ml de metanol (> 99%, Fisher Scientific, Reino Unido) durante 12 horas protegido da luz sendo, posteriormente, filtrado e colocado numa ampola de decantação,

à qual se adicionou 300 ml de n-hexano (95%, Lab-Scan analytical Sciences, Polónia) e procedeu-se a uma extração líquido – líquido.

De seguida, à biomassa retida no filtro adicionou-se 300 ml de diclorometano (99,8%, Fisher Scientific, Reino Unido) ficando em agitação durante 12 horas protegido da luz, sendo de seguida filtrado. Para a preparação do extrato da alga com água:etanol (25:75) adicionou-se 5g da alga acima referida a 75ml de água e 225 ml de etanol, mantendo o gobelé em agitação durante 12 horas, protegido da luz.

Os extratos obtidos após a filtração foram concentrados através da utilização de um rotavapor Laborota 4000 (Heidolph) a 40°C, obtendo-se, no final, a biomassa de cada uma das quatro frações. Estas foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) ($\geq 99.9\%$, Sigma, Alemanha) e mantidas a -20 °C até posterior utilização (Figura 3.2).

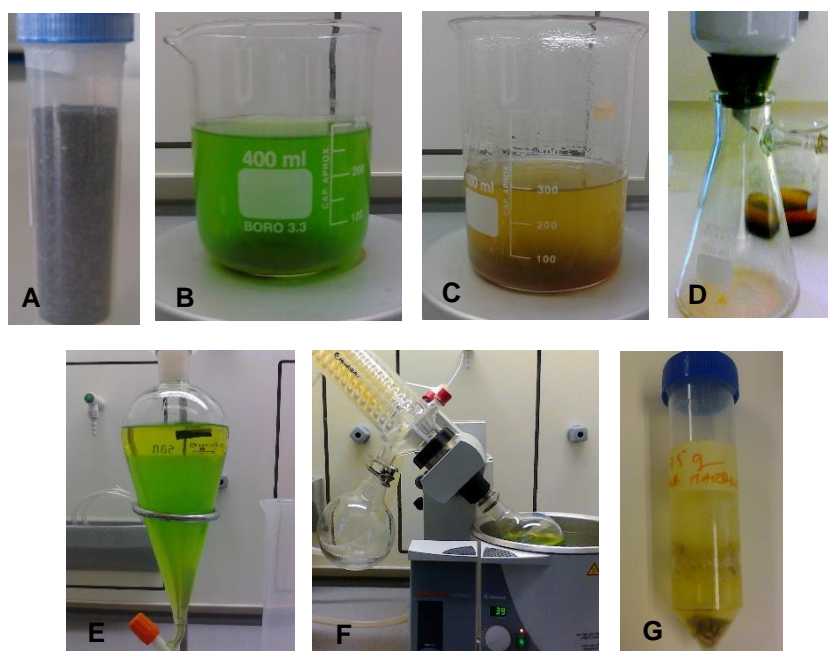


Figura 3.2 – Preparação dos extratos das amostras de algas.

A: Biomassa algas liofilizada e triturada; **B:** Extração no solvente orgânico, metanol; **C:** Extração em água:etanol (25:75); **D:** Filtração a vácuo, com funil acoplado a quitasato; **E:** Ampola de decantação com metanol (após filtração da alga) e n-hexano para extração líquido-líquido; **F:** Concentração dos extratos obtidos, em rotavapor, a 40 °C; **G:** Biomassa da fração água:etanol (25:75). (Fotografias de Ana Teresa Marques)

3.3.2. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

Os fitoquímicos constituem o maior grupo de compostos potencialmente bioativos, com capacidade antioxidante, que impedem alguns dos processos envolvidos no

desenvolvimento de doenças crónicas, nomeadamente, do cancro, doenças cardiovasculares e certas doenças degenerativas (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

A capacidade antioxidante total (CAT) está associada à propensão dos compostos fitoquímicos para a defesa dos constituintes celulares contra os danos oxidativos resultantes das reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

O interesse em empregar antioxidantes provenientes de fontes naturais para aumentar a vida útil dos alimentos é consideravelmente reforçado pela preferência dos consumidores por ingredientes naturais e preocupações sobre os efeitos tóxicos dos antioxidantes sintéticos.

Nos últimos anos, muitos recursos marinhos têm atraído a atenção na busca de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos medicamentos e alimentos saudáveis (Kuda *et al.*, 2005). Por este motivo, têm sido desenvolvidos diversos métodos de análise com o objetivo de determinar a atividade antioxidante das mais diversas matrizes alimentares, incluindo as algas marinhas (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

É de salientar que não é possível realizar, apenas, um método de avaliação da capacidade antioxidante, visto não refletir, exatamente, a complexidade das interações entre antioxidantes *in vivo* (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Estes métodos diferem entre si relativamente aos mecanismos e condições de reação, oxidantes e espécies alvo/marcadores, o que pode dar origem a resultados variáveis para os mesmos tipos de alimentos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante da alga em estudo e, posteriormente, dos sumos elaborados, foi efetuada utilizando o ensaio da inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e o teor total de compostos fenólicos foi determinado utilizando um ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu (FC).

3.3.2.1. Quantificação total de polifenóis

A Quantidade Total de Polifenóis (QTP) foi realizada segundo o método de Folin-Ciocalteu, adaptado a partir do trabalho realizado por Yu e colaboradores (2002).

Este método baseia-se numa reação colorimétrica promovida pelo reagente de Folin-Ciocalteu e é quimicamente suportado pela transferência de eletrões, em meio alcalino, de compostos fenólicos e outras espécies redutoras para o molibdénio, dando origem a complexos azuis. Estes complexos podem ser monitorizados espectrofotometricamente entre 750-765 nm (Karadag *et al.*, 2009).

Numa microplaca de 96 poços, adicionou-se 158 µl de água destilada, 2 µl de amostra e 10 µl de reagente de Folin-Ciocalteu. Ciocalteu (Fluka Biochemika, Sigma Aldrich, Suíça).

Após 2 minutos, adicionou-se 30 µl de carbonato de sódio, Na₂CO₃ a 20% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A reação foi incubada à temperatura ambiente, no escuro durante 1 hora, após a qual se mediu a absorvância, a um comprimento de onda de 755 nm, num leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTeK® Instruments, U.S.A.).

Para a construção da curva padrão, foram elaboradas quatro soluções de ácido gálico (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) a partir de uma solução de ácido gálico de 1mg/ml. A QTP foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

3.3.2.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma, Steinheim, Alemanha) pelas amostras em estudo foi avaliada a partir da adaptação do método descrito por Duan *et al.* (2006). Este método baseia-se na capacidade que este composto tem em mimetizar os radicais livres presentes no organismo humano.

O radical DPPH na presença de compostos antioxidantes é reduzido, perdendo a sua cor original, violeta, passando para amarelo pálido, com conseqüente diminuição da absorvância, a 517 nm.

Para a execução deste método, preparou-se, previamente, uma solução de DPPH 0,1 mM em metanol (Sigma Aldrich, Germany). Numa microplaca de 96 poços, adicionou-se 2 µl de cada amostra a 198 µl de DPPH (Figura 3.3). Incubou-se 30 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Os resultados foram obtidos espectralmente num leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTeK® Instruments, U.S.A.) a um comprimento de onda de 517nm. A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através do uso da seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde:

Abs_{controle} → absorvância da solução de DHHP + 2 µl de DMSO;

Abs_{amostra} → absorvância da solução de DPPH + 2 µl de amostra;

Abs_{branco} → absorvância da amostra (198 µl de metanol + 2 µl de amostra).

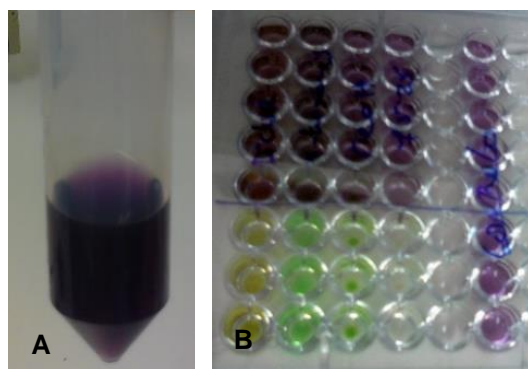


Figura 3.3 – A: Solução de DPPH; **B:** Microplaca de 96 poços com a adição das diferentes amostras ao DPPH e respetivos brancos (últimos 3 poços de cada coluna). (Fotografias de Ana Teresa Marques)

3.4 Desenvolvimento de sumos naturais com adição de algas

3.4.1 Ensaio preliminares

Para a formulação e produção do produto em estudo, foram utilizadas amostras de sumo de maçã produzido pela Frubaça CRL - Cooperativa de Produtores de Fruta e de Produtos Hortícolas, estabilizado por hiperpressão. O objetivo inicial seria utilizar, apenas, sumo de maçã, ao qual se adicionaria a alga vermelha, da espécie *Gelidium corneum*. No entanto, esta prática tornou-se inviável, devido ao facto da alga utilizada ter um sabor particularmente intenso, o que fez como que se tivessem de adicionar outros ingredientes, de forma a tornar o novo produto mais agradável.

Foram testados alguns sumos com misturas de diversas matérias-primas, em diferentes proporções, nomeadamente, a maçã, a framboesa, o abacate, os espinafres, o gengibre, a hortelã, a alga *Gelidium corneum* e a microalga espirulina (Figura 3.4).



Figura 3.4 – Formulações testadas com diferentes percentagens de diversas matérias-primas. (Fotografias de Ana Teresa Marques)

Pelo facto da espécie *Gelidium corneum* se tratar de uma macroalga, não foi possível incorporá-la, totalmente, no sumo, uma vez que esta não tem a capacidade de dissolução das microalgas, como é o caso da espirulina. Por este motivo, fez-se uma extração da alga no sumo, ou seja, incorporou-se a alga *Gelidium corneum*, em proporções que variaram entre 0,5% e 2% do sumo, com tempo de espera de 30 minutos e de uma hora tendo sido, posteriormente, filtrada com o auxílio de um coador.

As melhores formulações (num total de cinco) foram pré-selecionadas através de avaliação sensorial. Para tal, recorreu-se a um painel de provadores semi-treinado, composto pelos cinco elementos da direcção, que deram o seu parecer.

Com a realização destes pré-ensaios, foram obtidas duas variedades do sumo, para dar continuidade ao trabalho.

Os sumos foram processados a partir das variedades de maçã *Golden Delicious*, *Granny Smith* e *Jonagold*, sendo a maçã o seu constituinte principal. Foram, também, adicionados em menor percentagem outros hortofrutícolas, como a framboesa, os espinafres, o gengibre e a hortelã. De seguida, os sumos foram acondicionados em embalagens PET (politereftalato de etieno), com capacidade de 250 ml.

Até à sua utilização, os espinafres, o gengibre e a hortelã foram mantidos em condições de refrigeração (2-4°C) tendo a framboesa sido mantida a -18°C.

As algas foram armazenadas num frasco de plástico destinado ao efeito e vedado com película parafilme até serem utilizadas.

As análises de pH, teor de sólidos solúveis e cor foram realizadas diretamente na amostra de sumo, após homogeneização.

3.4.2. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram a maçã, a framboesa, os espinafres, o gengibre e a hortelã.

Pelo facto de se tratar do principal género alimentar, controlado pela empresa, desde o seu cultivo até ao seu processamento, é dado um especial destaque à maçã, concedendo-lhe um subcapítulo na introdução.

A framboesa, que constitui o segundo componente de um dos sumos elaborados, pertence à família das *Rosacea*, género *Rubus*. Embora a sua cultura em solo português ainda seja reduzida, tem havido um aumento significativo na sua produção nos últimos anos, já que os frutos produzidos em Portugal começaram a ter uma maior procura para exportação.

Estes frutos são ricos em fibras e vitamina C, para além de conterem teores importantes de ácido fólico, vitamina B1, B2 e também alguns minerais (magnésio,

potássio, cobre e ferro). São uma excelente fonte de compostos fenólicos, incluindo estilbenos, taninos, ácidos fenólicos e flavonoides. Dentro destes últimos, destacam-se as antocianinas, importante para a avaliação da maturidade dos frutos e responsáveis pela cor vibrante das framboesas (Freitas, 2011).

O espinafre é um produto vegetal valorizado pelo seu elevado teor vitamínico, especialmente em ácido ascórbico, α -tocoferol, vitamina K, carotenos e vitamina A. É um grande fornecedor de magnésio e cálcio, dois nutrientes essenciais à manutenção da saúde óssea. No entanto, este vegetal acumula ácido oxálico, um composto anti-nutricional, que pode reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais, como é o caso do ferro, magnésio e cálcio. O espinafre contém uma fonte importante de carotenoides, como o betacaroteno e a luteína, que são pigmentos lipossolúveis, com coloração amarela-alaranjada. A síntese destes pigmentos está intimamente ligada à síntese da clorofila, estando os seus níveis positivamente correlacionados. No entanto, os carotenoides podem ser menos visíveis devido à presença de clorofilas a e b, cuja sua cor verde predomina (Lima, 2012).



O gengibre é um rizoma da espécie *Zingiber officinale* utilizado como condimento comum para vários alimentos e bebidas. Como planta medicinal, o gengibre é uma das mais antigas e populares do mundo e tem sido, tradicionalmente, utilizado numa ampla gama de doenças, que incluem artrite, dores musculares, indigestão, dores de estômago, diarreia e náuseas. Alguns constituintes presentes no gengibre apresentam uma potente atividade anti-inflamatória, antioxidante e anti-cancerígena (Shukla, 2007).

A hortelã-verde (*Mentha spicata*), também conhecida como hortelã-vulgar, hortelã-das-hortas, hortelã-comum ou simplesmente hortelã, é uma planta herbácea perene, nativa da região do mediterrâneo, muito cultivada no país. É utilizada como tempero em culinária, como aromatizante em certos produtos alimentares ou para a extração do seu óleo essencial. Também é usada como planta medicinal, funcionando, maioritariamente, como estimulante gástrico e carminativo. O óleo essencial e os flavonoides são os responsáveis pela sua ação antisséptica, espasmolítica e estimulante das secreções gástricas (Cunha, 2006).

3.4.3. Formulação de protótipos

Os dois protótipos foram elaborados com os mesmos ingredientes de base, diferindo apenas num deles e na percentagem de alga adicionada. As respetivas formulações assim como a percentagem dos ingredientes utilizados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Formulações e percentagem de ingredientes de cada um dos protótipos.

Protótipo Sf_a	Ingredientes	Percentagens (%)
	Maçã	86
	Framboesa	10
	Gengibre	2
	<i>Gelidium corneum</i>	1
	Hortelã	1
Protótipo Se_a	Ingredientes	Percentagens (%)
	Maçã	88
	Espinafres	7
	Gengibre	2
	<i>Gelidium corneum</i>	2
	Hortelã	1

3.4.4. Processo de fabrico

O processo de fabrico do sumo de maçã tem início com a lavagem das maçãs em água hiperclorada. Esta etapa tem como objetivo a remoção de pequenas sujidades e sólidos grosseiros presentes na superfície da matéria-prima, além de reduzir, de forma considerável a carga microbiana. O processo de lavagem utilizado na empresa é realizado por imersão, no qual toda a superfície da fruta entra em contacto com a água de lavagem (Figura 3.5).

Segue-se a etapa da seleção das maçãs, onde se separam, cuidadosamente, as que estão firmes das extremamente maduras, estragadas, atacadas por lagartas e outros danos. O equipamento empregue consiste numa passadeira larga, ao longo da qual, os funcionários se posicionam.

Após a seleção, as maçãs são novamente lavadas, passando por um chuveiro e escovagem seguindo depois, diretamente, para o moinho de trituração. Na fase de trituração obtem-se uma pasta/polpa de fruta. Para se extrair o sumo, é utilizada uma prensa pneumática, de esteira contínua (*belt press*) (Figura 3.6)



Figura 3.5 – Lavagem das maçãs em água hiperclorada (Fotografia de Ana Teresa Marques)



Figura 3.6 – Prensa pneumática de esteira contínua (*belt press*) (Fotografia de Ana Teresa Marques)

Após ser filtrado pelas passadeiras, o sumo segue para um outro filtro onde são retiradas grande parte das fibras em suspensão, ou seja, remoção de sementes, polpa de fruta ou algumas impurezas que possam ultrapassar as barreiras. Seguidamente, o sumo é armazenado em tanques de forma cilíndrica, que conservam o sumo a uma temperatura entre 3°C a 4°C, sendo esta refrigeração feita com água e glicol. O sumo segue para a linha de enchimento onde é engarrafado e capsulado em garrafas de polietileno. As máquinas de enchimento apresentam um processo de lavagem das garrafas que consistem em invertê-las, de modo automático, sendo-lhes injetado um jato de água no seu interior que vai garantir a inocuidade das garrafas. Após esta lavagem, as garrafas seguem em direção ao enchimento onde é introduzido o sumo, sendo capsuladas de imediato (Figura 3.7). Posteriormente, estas passam pelo detetor de metais, que tem a função de detetar pequenas partículas metálicas que possam estar a contaminar o produto (Figura 3.8). De seguida, as garrafas são rotuladas automaticamente, com rótulos diferentes, consoante a empresa a que se destinam.

Uma vez rotuladas, as garrafas são armazenadas em caixas resistentes à compressão, o que possibilita o transporte de grandes pesos. Nesta fase, o sumo segue para as máquinas de alta pressão (HPP) onde sofre tratamento. No processo de embalamento, a quantidade de sumo embalado varia consoante a encomenda do cliente/ consumidor. Depois desta etapa, as garrafas são colocadas em caixas e armazenadas em câmaras frigoríficas, a temperaturas entre os 2 a 4°C. Não poderá ser expedido produto com mais de 25 dias.



Fig. 3.7 – Máquina de enchimento e capsulagem (Fotografia de Ana Teresa Marques)



Fig. 3.8– Detetor de metais (Fotografia de Ana Teresa Marques)

Para a elaboração dos dois protótipos (A e B), foi utilizado sumo de maçã acabado de fazer. De seguida, este sumo foi levado para o laboratório da fábrica, onde se procedeu à elaboração dos sumos com a adição de algas.

O protótipo A é constituído por maçã (86%), framboesa (10%), gengibre (2%), alga *Gelidium corneum* (1%) e hortelã (1%) e o protótipo B contém maçã (88%), espinafres (7%), gengibre (2%), alga *Gelidium corneum* (2%) e hortelã (1%), tendo sido adicionado a ambos os sumos, 0,1% de ácido ascórbico.

Os dois sumos foram sujeitos a trituração com uma máquina (Philips HR 2095, China) de forma a se obter duas bebidas homogéneas. As algas foram incorporadas, logo de seguida, nos sumos, com um tempo de espera de uma hora, sendo, posteriormente, filtradas com o auxílio de um coador. Prosseguiu-se com o engarrafamento em garrafas PET de 250 ml e respetiva capsulagem. Os sumos foram sujeitos ao tratamento por HPP e, por fim, foram armazenados a temperatura entre 2 °C a 4 °C até à sua utilização.

Foram, também, elaborados dois sumos idênticos aos protótipos A e B, mas sem a adição da alga *Gelidium corneum*, que serviram de controlo para as diferentes análises realizadas.



Figura 3.9 – Da esquerda para a direita: Amostras de sumo de framboesa com algas (sf_a) e sumo de framboesa controlo (sf_c) seguidas de sumo de espinafres controlo (se_c) sumo de espinafres com alga (se_a). (Fotografia de Ana Teresa Marques)

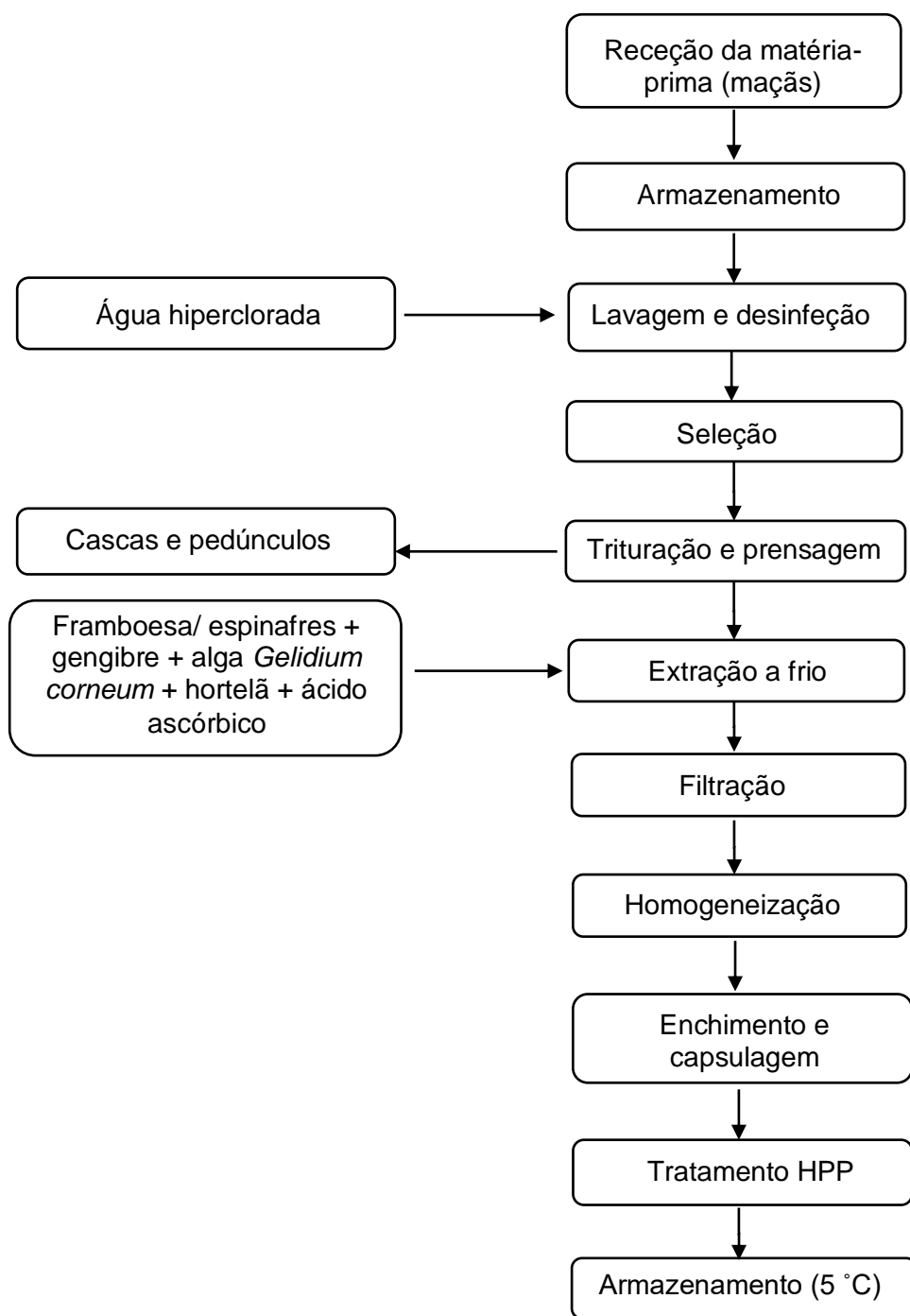


Figura 3.10 - Diagrama de produção dos sumos de framboesa (A) e de espinafres (B) com adição da alga *Gelidium corneum* (os sumos controlo não tiveram adição da alga).

3.5. Análises físico-químicas dos produtos finais

3.5.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada diretamente no sumo, sem diluições, à temperatura ambiente e após calibração com duas soluções tampão a pH=4 e pH=7. Para este procedimento foi utilizado um potenciómetro marca HANNA INSTRUMENTS e modelo HI 2211 pH/ORP Meter munido de um elétrodo de vidro. A realização do procedimento e a apresentação dos resultados foram elaboradas de acordo com a NP EN 1132:1996.

3.5.2. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (°Brix)

O índice refratométrico quantifica a percentagem de resíduo seco solúvel, ou seja, os sólidos dissolvidos que estão presentes no produto em questão.

O teor de sólidos solúveis foi determinado com um refratómetro digital marca HANNA INSTRUMENTS e modelo HI 96801. A amostra foi homogeneizada e verteram-se algumas gotas de produto para a superfície do prisma no equipamento; foram realizadas duas leituras da mesma amostra e calculada a média. Os dados são apresentados em gramas de sacarose por 100g de líquido ou graus Brix (°Brix), com base na norma NP EN 12143:1999.

3.5.3. Determinação da acidez titulável

A acidez total foi determinada por titulação com uma solução alcalina de hidróxido de sódio 0,25M em 25 ml de amostra de sumo. O ponto final de titulação foi detetado por potenciometria a pH = 8,11 e os resultados foram expressos em ácido málico (g/100 ml de produto) de acordo com a norma NP EN 12147:1999. Esta análise é de grande importância na avaliação do estado de conservação de um alimento, porque o processo de decomposição altera quase sempre a concentração de iões hidrogénio.

3.5.4. Determinação da cor

A colorimetria consiste na medição da cor baseada nos comprimentos de onda das três cores primárias. A determinação da cor é um indicador do estado de maturação do produto, devido à evolução dos pigmentos, que são característicos de cada fruto. A medição da cor teve como objetivo avaliar a evolução da cor nos sumos com algas, ao longo do tempo de vida útil dos produtos.

Para a análise instrumental da cor, recorreu-se à utilização de um colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta CR-A503, Japão), previamente calibrado com um padrão branco. Foram feitas nove leituras de cada amostra de sumo. Colocou-se 20 ml de cada amostra num gobelé com capacidade de 100 ml e introduziu-se a abertura do colorímetro sobre a amostra, sem contactar com a mesma, formando uma linha perpendicular à base do gobelé. Os resultados foram expressos de acordo com o sistema de coordenadas CIELab. O eixo L* corresponde à luminosidade que pode variar de preto (0) a branco (100), o eixo a* varia de verde (-60) a vermelho (+60) e o eixo b* varia de azul (-60) a amarelo (+60).

3.5.5. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma, Steinheim, Alemanha) pelas quatro amostras de sumo em estudo foi avaliada pelo método descrito em 3.3.2.2.

3.5.6. Determinação da proteína bruta

O teor de proteína bruta dos produtos finais foi determinado recorrendo à norma portuguesa NP 1986:1991 (ISO 8968-1:2001) que tem como base o método de Kjeldahl.

Os principais processos deste método são a digestão ácida, seguida de uma destilação e uma titulação. A digestão inicia-se com a adição de ácido sulfúrico concentrado (Sigma- Aldrich, Alemanha) à amostra juntamente com pastilhas de sulfato de cobre (Merck, Alemanha), que atuam como catalisador, acelerando a oxidação da matéria orgânica. Esta etapa é realizada num digestor de Kjeldahl, (Foss, Digestor 2006) a altas temperaturas (400°C). Após a digestão da amostra, procede-se a uma destilação da mesma num destilador automático de Kjeldahl (Foss, Kjeltec™ 2100), onde é adicionado NaOH (AnalaR Normapur, Alemanha) à amostra. Por fim, é realizada uma titulação manual, com recurso a HCl 0,1N (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como titulante. A determinação do teor de proteína bruta é calculado multiplicando o teor de azoto por um fator convencional:

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{[(V_a - V_b) \times \text{concentração de ácido} \times 6,25 \times 0,014]}{m} \times 100$$

Onde V_a corresponde ao volume do titulante usado para a amostra (ml), V_b corresponde ao volume do titulante usado para o branco (ml) e m à massa da amostra (g).

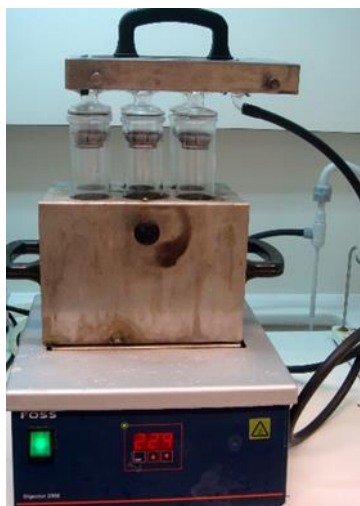


Figura 3.11 – Etapa da digestão, realizada num digestor de Kjeldahl a altas temperaturas (400°C). (Fotografia de Ana Teresa Marques)

3.5.7. Teor de minerais e oligoelementos

A composição em minerais e oligoelementos das amostras de sumo foi avaliada pelo laboratório externo Globallab – Ensaios Químicos e Microbiológicos SA, (Marinha Grande, Portugal) acreditado. Os minerais quantificados foram o cálcio, o sódio, o potássio e o magnésio. Quanto aos oligoelementos, foram quantificados, o cobre, o zinco, o ferro e o manganês. Avaliaram-se, também, os teores de dois metais pesados, nomeadamente, chumbo e cádmio.

3.5.8. Teor de vitaminas

A avaliação do conteúdo vitamínico das amostras de sumo foi, também, realizada no laboratório externo Globallab.

Foram quantificadas as vitaminas B1, B2 e C (hidrossolúveis) e a vitamina A (lipossolúvel).

3.6. Análises microbiológicas

Procedeu-se ao tratamento de 5 amostras para cada tempo de análise, nomeadamente, para o tempo 0 (t_0), o tempo 15 (t_{15}) e o tempo 30 (t_{30}). Para o tempo zero, além das 5 amostras sujeitas a tratamento HPP, enviaram-se mais 5 amostras sem HPP, sendo todas analisadas de seguida, a nível microbiológico. Para a análise das amostras ao longo do tempo, 15 e 30 dias após produção (t_{15} e t_{30}), os sumos foram

armazenados numa câmara de refrigeração a com temperaturas entre 2°C a 4 °C em garrafas transparentes de polietileno fechadas. O trabalho experimental foi realizado no laboratório externo Globalab – Ensaios Químicos e Microbiológicos SA, Marinha Grande, Portugal. Às amostras de sumo de framboesa com algas e com espinafres, realizaram-se os seguintes ensaios: contagem de Microrganismos Totais a 30°C (ISO 4833-1:2013), contagem de *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001), pesquisa de *Salmonell spp* (ISO 6579:2002), Contagem de Bolores (ISO 21527:2008), e contagem de leveduras (ISO 21527-2008) (Anexo III).

3.7. Análise sensorial

A qualidade sensorial de um alimento é determinada por um conjunto de características que são avaliadas mediante os órgãos sensoriais quando expostos a estímulos físicos, químicos e físico-químicos. As metodologias desenvolvidas permitem conhecer os pontos fortes e fracos dos produtos, do ponto de vista sensorial, nomeadamente, a aparência, a cor, o odor, entre outros (Giboreau *et al.*, 2004).

No que respeita aos sumos de fruta, referidos neste trabalho, a cor é um dos atributos mais importantes na preferência do consumidor e tem sido implementada como parâmetro de qualidade em diferentes indústrias de sumos. Também tem sido utilizada, em diversos estudos, como um indicador da qualidade nutricional e organoléptica durante os tratamentos de processamento/conservação e subsequente armazenamento dos sumos. Em relação às restantes características sensoriais, tais como, o aroma, a doçura, acidez, entre outros, os consumidores procuram sumos de elevada qualidade sensorial que se assemelhem, o mais possível, aos frutos em fresco (Barba *et al.*, 2012).

A análise sensorial fornece respostas numéricas precisas em três abordagens metodológicas complementares:

- 1) Testes discriminativos que permitem a deteção da presença ou ausência de diferenças sensorial entre produtos;
- 2) Testes descritivos que quantificam as propriedades sensoriais através de descritores sensoriais adequadas;
- 3) Testes afetivos ou hedónicos que medem a valorização dos produtos, por parte dos consumidores. Estes podem ser classificados em testes, que avaliam a preferência do consumidor perante a comparação entre dois ou mais produtos e testes de aceitabilidade que avaliam o grau com que os consumidores gostam ou não de um produto.

O conhecimento das características sensoriais requeridas pelos consumidores é um dos parâmetros mais importantes na análise sensorial, no que respeita ao desenvolvimento de novos produtos e no marketing (Giboreau, *et al.*, 2004).

A avaliação sensorial foi efetuada na sala de análise sensorial da ESTM. As amostras em estudo foram avaliadas, ao vigésimo nono dia de produção, por um painel semi-treinado de 30 provadores. Estas foram codificadas com as letras sf_a e se_a, sendo sf_a – sumo de framboesa com algas e sf_b – sumo de espinafres com algas.

Foram avaliadas as características sensoriais de cada um dos sumos, bem como a preferência e aceitação dos novos produtos por parte dos provadores, através da aplicação de uma Folha de Prova Sensorial (Anexo IV). Os parâmetros avaliados foram: aparência, cor, sedimentação, partículas em suspensão, aroma, doçura, acidez, amargo, *flavour* a produtos do mar, viscosidade, grau de aceitação e seleção da amostra preferida. Foi utilizada uma escala numérica de 1 a 5, tanto a nível da aceitabilidade (de extremamente desagradável a extremamente agradável) como a nível da intensidade (de pouco intenso a extremamente intenso) de cada uma das características dos produtos. O Anexo V apresenta algumas imagens referentes à prova sensorial das duas amostras.

3.8. Análise estatística

Os parâmetros da cor foram os únicos sujeitos a análise estatística, dado que foram realizado em triplicado e ao longo do tempo de armazenamento das amostras dos sumos, logo após a produção (t_0) e no final do tempo de armazenamento (t_{30}).

Aplicou-se o teste da análise da variância (ANOVA) com dois fatores, do programa IBM SPSS 20, para avaliação das diferenças significativas e interações entre os tipos de amostras de sumo (com e sem algas) e os tempos de armazenamento (t_0 e t_{30}).

Neste estudo, pretendia-se estudar o efeito não só de cada um dos fatores, mas também a sua interação. Assim, foi determinada a interação dos fatores "tipo de sumo" (tp_sumo) e "tempo de armazenamento" (tempo). Considerando os dois fatores isoladamente é possível compreender a influência da composição da amostra, independentemente do tempo de armazenamento e vice-versa, nos parâmetros analisados. Quando foi encontrado um efeito de interação estatisticamente significativo (tp_sumo x tempo), ($p < 0,05$), os dois fatores foram avaliados simultaneamente utilizando o modelo de médias marginais estimadas. O Teste t-student foi utilizado para comparação de médias. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$ (com um intervalo de confiança de 95%). Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Recolha e preparação das amostras da alga *Gelidium corneum*

A fase de amostragem é um passo de especial importância, na recolha de algas marinhas.

Em relação às macroalgas, em geral, as alturas de maior produção de biomassa, em Portugal, verificam-se entre junho e setembro. No entanto, a época mais propícia à sua apanha, em São Martinho do Porto, é entre julho e novembro.

Quanto à identificação taxonómica das macroalgas, constata-se que o seu aspeto macroscópico facilita a identificação da espécie, com o auxílio de guias de identificação. Deste modo, a espécie recolhida na baía de São Martinho do Porto foi identificada com o auxílio de uma chave de identificação, adaptada de Pereira, 2009. Verificou-se que a alga pertence à divisão *Rhodophyta* (alga vermelha), género *Gelidium* e espécie *Gelidium corneum*.

4.2. Otimização da produção dos extratos de algas

Um dos objetivos deste trabalho foi a avaliação do potencial antioxidante da alga *Gelidium corneum*.

Os métodos escolhidos para a avaliação da capacidade antioxidante da alga e, posteriormente, dos sumos com a adição da alga, foram a capacidade de redução do radical DPPH e a quantificação total de polifenóis (QTP). A razão da escolha destes métodos prende-se com o facto do composto DPPH ser um radical relativamente estável e funciona como exemplo do que ocorre com os radicais livres no organismo humano (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006) e porque polifenóis têm sido descritos como compostos com elevada atividade antioxidante, tendo capacidade para captar radicais livres e reduzir outros compostos (Karadag *et al.*, 2009).

Devido à variação na polaridade entre antioxidantes, não há apenas um solvente inteiramente satisfatório para a extração de todos os antioxidantes presentes num alimento. No entanto, existem estudos que indicam que o metanol é especificamente eficaz na extração de polifenóis tendo, este extrato, exibido a maior atividade antioxidante em muitas espécies de algas (Yildiz, 2014).

A quantificação total de polifenóis dos extratos foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (3.3.2.1.), obtendo-se os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) (Figura 4.1)

Tal como pode ser observado pela Figura 4.1, o extrato da alga em metanol é o que apresenta maior teor em polifenóis totais ($44,19 \text{ mg} \pm 0,14 \text{ mg EAG/g}$) já os restantes extratos, apresentam todos valores significativamente mais baixos e muito semelhantes entre eles. O extrato da alga em diclorometano revela um valor de $4,77 \pm 0,09 \text{ mg EAG/g}$, em n-hexano o valor é de $4,27 \pm 0,14 \text{ mg EAG/g}$ e em 75% etanol 25% água, de $4,62 \pm 0,03 \text{ mg EAG/g}$.

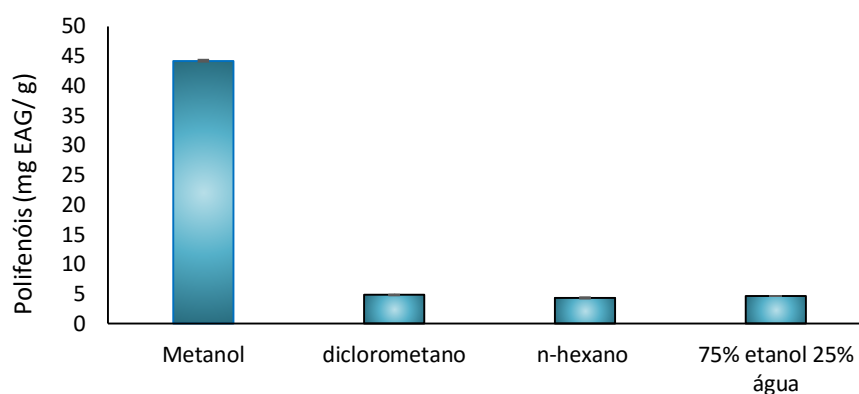


Figura 4.1 - Quantidade Total de Polifenóis (QTP) em mg EAG/g para os diferentes extratos da alga. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=3).

A capacidade de redução do radical DPPH (determinada pelo método descrito em 3.3.2.2.) demonstrada pelos diferentes extratos da alga em estudo encontra-se representada na Figura 4.2.

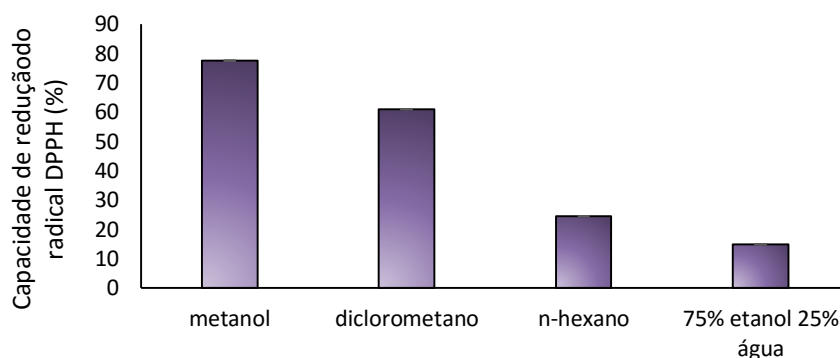


Figura 4.2 - Capacidade de redução do radical DPPH por parte dos diferentes extratos da alga.

Verifica-se que a fração metanólica é onde a alga apresenta maior capacidade de redução do radical DPPH (77,49%), seguida da fração do diclorometano (60,89%) e do extrato da alga em n-hexano (24,46%). Já a fração de 75% etanol 25% água é a que apresenta a menor capacidade de redução do radical (14,79%). Estes resultados indicam

que a alga *Gelidium corneum* revela maior capacidade antioxidante na fração polar (metanólica), seguida da fração com polaridade intermédia (diclorometano) (Pinteus, 2011).

Uma vez que o extrato da alga em metanol é o que apresenta, simultaneamente, maior teor em polifenóis e maior capacidade de redução do radical DPPH, é possível constatar que existe correlação entre a quantidade de polifenóis e a capacidade de redução do radical DPPH. Esta evidência é suportada por diversos estudos que têm encontrado excelentes correlações lineares entre os perfis fenólicos totais e a capacidade antioxidante determinada pelo radical DPPH (Karadag *et al.*, 2009). Este último ensaio é um dos mais utilizados para a determinação e comparação do estado antioxidante de compostos fenólicos, que podem atuar como doadores de H⁺, estabilizando, assim, o radical DPPH.

4.3. Caracterização físico-química das amostras finais

4.3.1. Valores de pH

Na Figura 4.3 estão representadas as médias (\pm DP) do pH obtidas para as amostras nos tempos 0, 15 e 30.

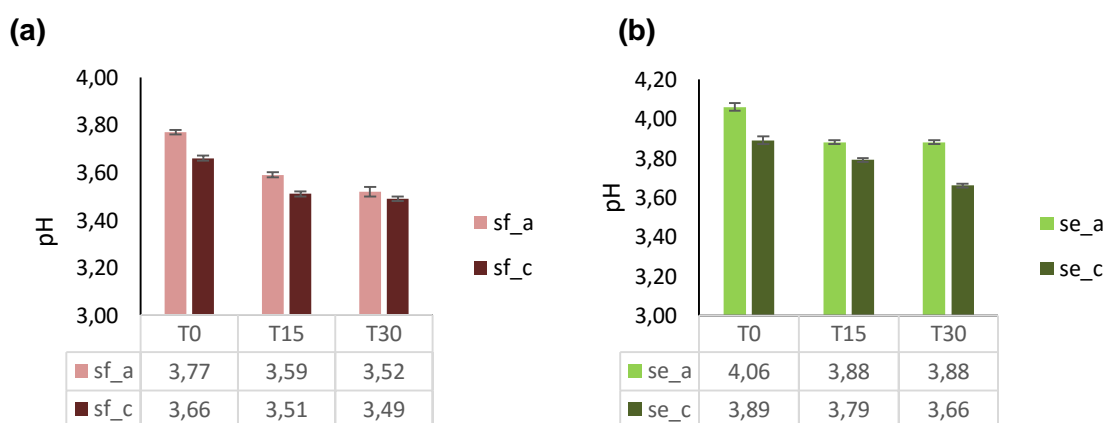


Figura 4.3 - Valores médios (\pm DP) do pH das amostras finais, para as amostras de sumo de framboesa **(a)** e de sumo de espinafres **(b)**, ao longo do tempo de armazenamento.

Pela análise da Figura 4.3 verifica-se que a adição do extrato da alga influenciou o pH dos dois tipos de sumo, observando-se um aumento deste valor. No caso do sumo de framboesa, existe uma tendência de decréscimo do pH, ao longo do tempo, tanto para o sf_a como para o sf_c, sendo que esta é mais acentuada entre o t₀ e o t₁₅, para ambos os sumos.

Quanto ao sumo de espinafres, verifica-se uma diminuição do pH, até ao t_{15} , tanto para o sumo com algas como para o seu controlo. Todavia, do t_{15} até ao t_{30} o pH do sumo com algas apresenta-se estável, enquanto o pH do sumo controlo sofre novo decréscimo.

No entanto, tendo em conta as pequenas alterações observadas nos valores de pH, pode-se afirmar que estas serão devidas a erros experimentais, nomeadamente, à calibração do equipamento e estabilidade do eléctrodo de pH. Por esta razão, é possível afirmar que o pH se mantém, aproximadamente, constante ao longo dos 30 dias de vida útil dos sumos.

É de realçar que o pH do sumo de framboesa (com e sem algas) é sempre mais baixo que o pH do sumo de espinafres. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que os frutos geralmente apresentam um pH mais ácido ($< 4,5$) em comparação com o pH dos hortícolas ($> 4,5$), devido à presença de ácidos orgânicos (de acordo com Tasnim *et al.*, 2010, citado por Mgaya-Kilima *et al.*, 2014).

4.3.2. Valores de Teor de Sólidos Solúveis (°Brix)

Na Figura 4.4 estão representadas as médias (\pm DP) obtidas para o °Brix e comparação entre as amostras.

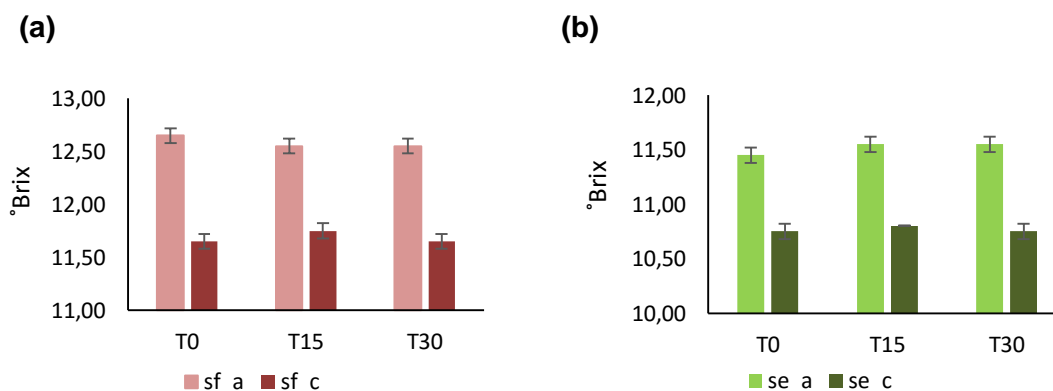


Figura 4.4 - Valores médios (\pm DP) do Teor de sólidos Solúveis (°Brix), para as amostras de sumo de framboesa **(a)** e de sumo de espinafres **(b)**, ao longo do tempo de armazenamento.

Relativamente ao °Brix, verifica-se que, tal como para o pH, os valores aumentam com a adição da alga aos dois tipos de sumo, o que indica a presença de monossacarídeos na alga *Gelidium corneum*.

O facto de ter havido passagem de algumas partículas de alga liofilizada para os sumos, que a etapa da filtração não conseguiu remover, pode também ter contribuído para o aumento do °Brix.

Ao longo dos 30 dias, este parâmetro revela-se bastante estável, não sofrendo alterações significativas, fator este, necessário para a preservação da qualidade dos sumos de fruta (Bhardwaj and Pandey, 2011, citado por Mgaya-Kilima, *et al.*, 2014).

4.3.3. Valores da acidez titulável

A Figura 4.5 representa os valores de acidez titulável das amostras, no entanto, pela impossibilidade de serem realizados no local de fabrico das mesmas, estes resultados são apresentados apenas para o t₃₀.

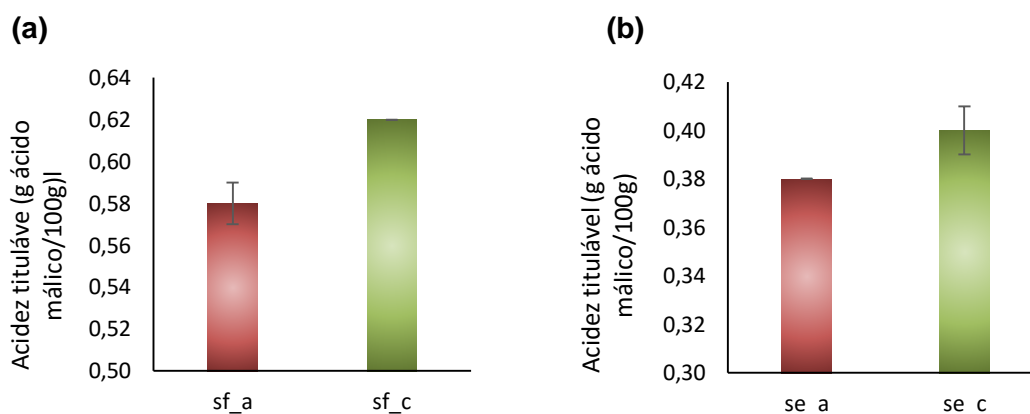


Figura 4.5 - Valores médios (\pm DP) de acidez titulável, para as amostras de sumo de framboesa **(a)** e de sumo de espinafres **(b)**, ao t₃₀.

Após a análise da Figura 4.5 verifica-se que tanto a amostra sf_a como a se_a apresentam menor acidez relativamente aos seus controlos. Estes resultados estão de acordo com os valores de pH acima referidos, que são superiores nos sumos com algas.

Verifica-se, também, que todos os sumos apresentam valores de acidez dentro do limite estipulado, sendo o intervalo de acidez para o sumo maçã entre 0,36 a 0,80 g de ácido málico/100g (<http://www.hannacom.pt/>).

4.3.4. Cor

A cor do produto é um parâmetro de qualidade de grande importância para a aceitação por parte do consumidor. Contudo, as condições associadas ao processamento e ao armazenamento dos sumos podem levar a várias alterações, com perda de pigmentos e cor dos frutos e hortícolas (Keenan *et al.*, 2012).

As representações gráficas dos resultados são apresentadas na Figura 4.6.

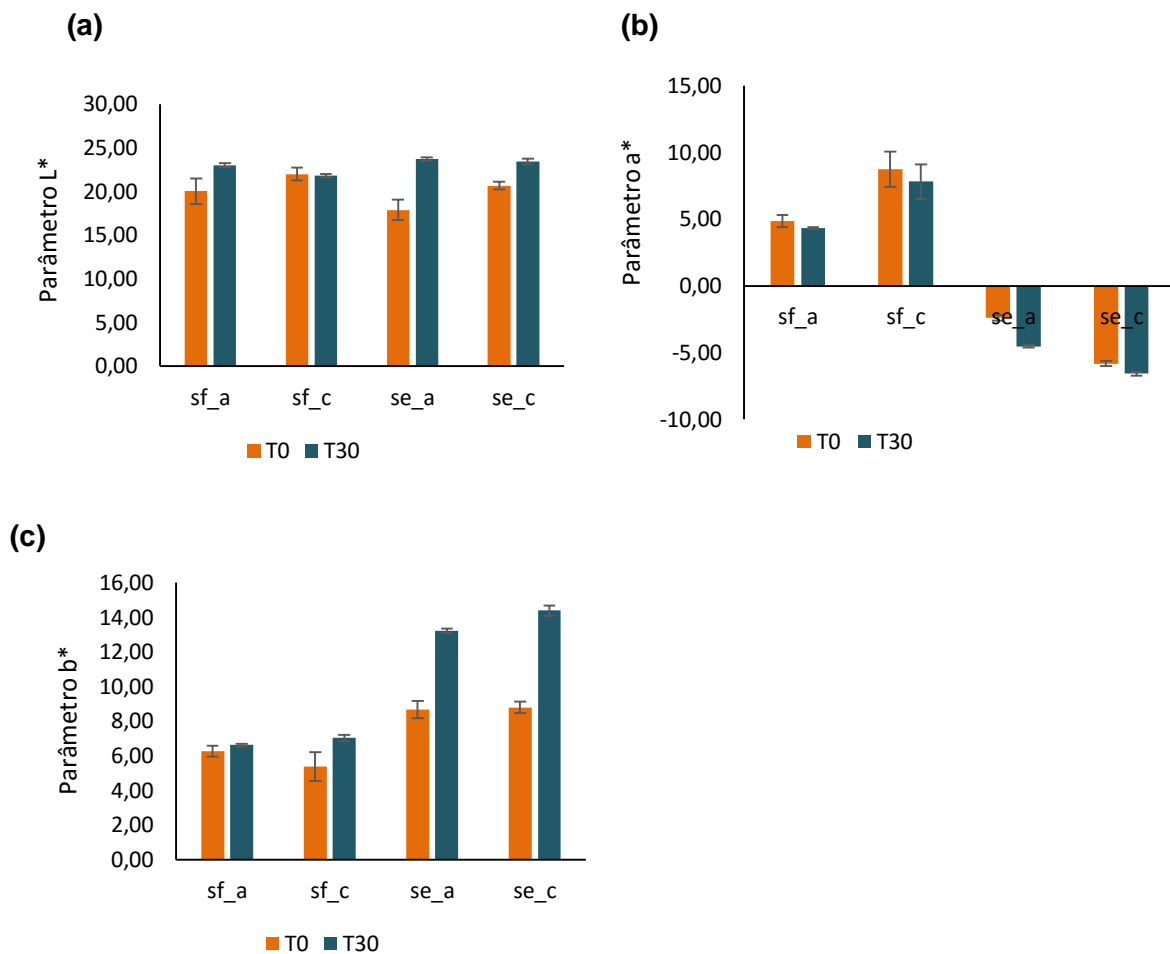


Figura 4.6 - Valores médios (\pm DP) dos parâmetros L* (a), a* (b) e b* (c), para as amostras de sumo de framboesa e de espinafres, ao longo do tempo de armazenamento.

Observando a Figura 4.6 verifica-se que as amostras sf_a e se_a seguem uma tendência semelhante aos respetivos controlos (sf_c e se_c). No entanto, apresentam valores diferentes, o que é atribuído à migração de compostos das algas durante o processo de extração. Alguns dos compostos provenientes das algas podem ser compostos fenólicos, pigmentos (clorofilas e carotenoides) entre outros que influenciaram a cor dos sumos (Nagai and Yukimoto, 2003).

Relativamente ao parâmetro L*, observa-se que as duas amostras de sumo de framboesa não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Todavia, a interação das amostras ao longo do tempo demonstram diferenças significativas, sendo que para o t₀, a amostra sf_c apresenta maior luminosidade e para o t₃₀ verifica-se um aumento do valor de L* na amostra sf_a. No caso do sumo de espinafres, verificam-se diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), sendo que a amostra se_c apresenta valores de L* mais elevados. A interação das amostras ao longo do tempo evidencia uma maior luminosidade da amostra se_c, para o t₀ ($p < 0,05$). No entanto, no final do tempo de

validade (t_{30}), não existem diferenças significativas entre as amostras ($p > 0,05$), sendo que ambas apresentam valores superiores em relação ao t_0 .

No que diz respeito ao parâmetro a^* das amostras de sumo de framboesa, constata-se que todas as médias foram positivas. Porém, a amostra sf_a apresenta valores de a^* significativamente mais reduzidos que a amostra sf_c, para ambos os tempos, o que indica que o tipo de amostra tem influência neste parâmetro. Assim, o facto da amostra sf_a apresentar uma tonalidade menos avermelhada, deve-se à interação dos pigmentos existentes no sumo com determinados pigmentos da alga *Gelidium corneum*, tais como a clorofila a e a ficoeritrina (Pereira, 2004). Verifica-se, também, que o tempo de armazenamento não tem um efeito significativo no valor de a^* , apresentando, apenas uma ligeira redução, para ambas as amostras. Este resultado indica que os pigmentos responsáveis pela tonalidade vermelha se mantiveram minimamente estáveis (tendo em conta que a redução no valor de a^* se correlaciona, geralmente, com a degradação das antocianinas) (Keenan *et al.*, 2012). Quanto ao sumo de espinafres, constata-se que ambas as amostras apresentam a cor verde, visto que o parâmetro a^* foi sempre negativo. Este resultado já era esperado, uma vez que as clorofilas presentes nos espinafres mascaram os restantes pigmentos (Lima, 2012). Neste caso, a amostra se_a apresenta valores de a^* significativamente menos negativo que a amostra se_c, para ambos os tempos, constatando-se que o tipo de amostra influencia o valor de a^* . Este resultado explica-se, novamente, pela migração dos pigmentos da alga para o sumo, tornando-se a sua cor menos verde e mais amarelada. Ambas as amostras apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo, ficando com uma tonalidade mais verde (valores de a^* mais negativos). Esta acentuação da cor verde poderá estar relacionada com a predominância das clorofilas presentes nos espinafres, bem como na alga *Gelidium corneum*. Estes resultados estão concordantes com os de Wang *et al.*, 2013, que após submeterem purés de espinafres ao processo de HPP a 600 MPa, verificaram que as amostras obtiveram valores de a^* mais negativos, teores mais elevados de clorofila a e diminuição de atividade da clorofilase e polifenoloxidase, o que permitiu inibir a degradação da clorofila e as reações de escurecimento enzimático, durante o armazenamento.

Tendo em conta os resultados do parâmetro b^* para as amostras de sumo de framboesa, verifica-se que estas apresentam valores positivos, ou seja, uma cor amarelada. Não se observam diferenças significativas entre a amostra com algas e a amostra controlo. Ao analisar a interação do tempo com o tipo de amostra, verifica-se a existência de diferenças significativas para o t_0 , com a amostra sf_a a apresentar valores de b^* superiores, no entanto, no t_{30} , não existem diferenças significativas entre as amostras, sendo que ambas apresentam valores superiores aos do t_0 . Embora as duas

amostras apresentem diferenças significativas ao longo do tempo, constata-se que a amostra sf_a apresenta menor variabilidade em relação a este parâmetro. No caso do sumo de espinafres, também se verifica que ambas as amostras apresentam valores positivos (amarelos), apresentando variabilidade entre si. Para o t_0 não existem diferenças significativas entre as amostras, enquanto no final do tempo (t_{30}) a amostra se_c apresenta-se mais amarelada. Ao longo do tempo, ambas as amostras apresentam diferenças significativas ficando mais amarelas no final do tempo de armazenamento. Contudo, a amostra se_a apresenta menor variabilidade em relação à amostra controlo (se_c). O facto de ambos os tipos de sumo com algas mostrarem menor variabilidade ao longo do tempo para o parâmetro b^* , fortemente relacionado com fenómenos de oxidação, poderá indicar que os antioxidantes presentes promovem um efeito estabilizador destes sumos.

4.3.5. Capacidade de redução do radical DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante dos sumos foi realizada através da medição da capacidade dos mesmos em sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está esquematizado na Figura 4.7.

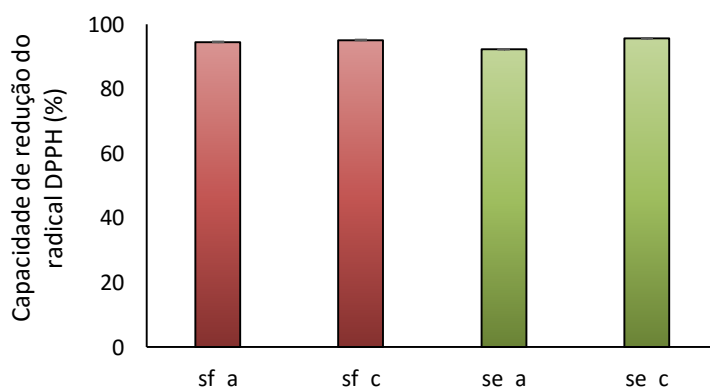


Figura 4.7 - Valores médios (\pm DP) da capacidade antioxidante para as amostras de sumo de framboesa e de sumo de espinafres, para o t_{30} .

Após a análise da figura, verifica-se, no t_{30} , que as amostras sf_a e sf_c apresentam uma capacidade de redução do radical DPPH de 94,51% e 95,10%, respetivamente. Quanto aos sumos de espinafres, constata-se que a amostra se_a e a amostra se_c apresentam uma atividade de 92,17% e 95,60%, respetivamente. Embora não seja muito significativa, verifica-se um decréscimo da capacidade antioxidante em ambos os sumos com algas.

Uma vez que estes sumos são constituídos por diferentes matrizes alimentares que, por sua vez, contêm uma mistura de compostos bioativos, os resultados desta

junção tanto poderão ser sinérgicos como antagónicos. Estudos realizados por Keenan *et al.*, 2012, demonstraram que os sumos compostos por diversos ingredientes, sujeitos ao processo de HPP, apresentaram comportamentos bioquímicos muito diferentes em relação aos seus componentes individuais, sendo que os primeiros apresentam maior degradação de compostos bioativos. Estes resultados poderão ser justificados pela rutura do conteúdo intracelular, após a etapa da mistura, o que faz libertar as enzimas dos diferentes componentes do sumo, promovendo a sua interação. Adicionalmente, o processo de mistura pode levar à degradação não enzimática, através da introdução de oxigénio (Keenan *et al.*, 2012).

Porém, enquanto alguns estudos reportam uma diminuição na atividade antioxidante, outros demonstram um aumento, entre as diferentes formulações (Keenan *et al.*, 2012; Oey *et al.*, 2008).

Há que realçar, também, a reduzida capacidade de redução do radical DPPH da alga *Gelidium corneum* na fração 75% etanol 25% água (inferior a 15%) comparada com a capacidade dos restantes extratos utilizados neste trabalho (24,46% para o n-hexano, 60,89% para o diclorometano e 77,49% para o metanol).

É de referir que, dos quatro solventes acima utilizados, o extrato de etanol e água seria o único que apresenta viabilidade para a extração no sumo, uma vez que todos os outros solventes são tóxicos.

Acresce o facto de se ter utilizado, unicamente, a água existente nos sumos como solvente de extração de compostos antioxidantes da alga *Gelidium corneum*, o que limitou a existência de resultados mais promissores. No entanto, para utilização em alimentos, os extratos em água apresentam vantagens óbvias em relação à certificação e segurança alimentar.

Por último, o facto do processo de extração ser realizado a frio, reduz a velocidade de difusão dos compostos solúveis, dando origem a um extrato mais fraco devido a uma extração incompleta, num intervalo de tempo especificado (Whitehead, 2005).

Atualmente, estão a ser estudados novos métodos de extração capazes de superar os inconvenientes acima mencionados, nomeadamente, a extração com fluido supercrítico, no qual o fluido é forçado a uma pressão e temperatura superior ao seu ponto crítico (SFE) e extração com água subcrítica, ou seja, com água quente sob pressão (SWE) (Herrero, 2006).

4.3.6. Determinação da proteína bruta

Os resultados da determinação da proteína bruta pelo método de Kjeldahl estão esquematizados na Figura 4.8.

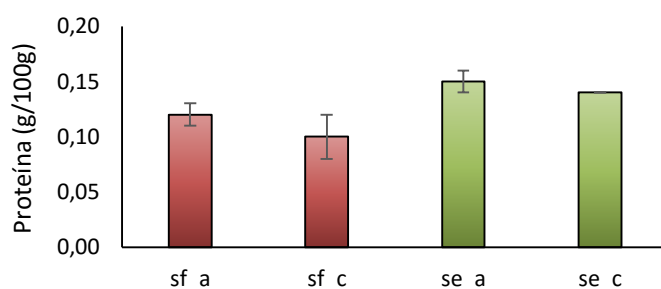


Figura 4.8 – Valores médios (\pm DP) do teor de proteína das amostras de sumo de framboesa e de sumo de espinafres, para o t_{30} .

Após observação do gráfico, verifica-se que as amostras de framboesa com e sem algas apresentam valores de 0,12g e 0,10g de proteína por 100g, sendo que as amostras de espinafres praticamente não revelam diferenças (0,15g/100g para se_a e 0,14g/100g para se_c).

Embora o conteúdo proteico das algas seja muito superior ao dos vegetais terrestres, tendo a alga *Gelidium corneum* registado o maior teor em proteínas (27,65%) num estudo de El Din e El Sherif, constata-se, neste trabalho, que a quantidade de alga adicionada (entre 1% e 2%) não influenciou os níveis de proteína, para ambos os sumos.

As amostras de sumo com espinafres (com e sem algas) apresentam níveis ligeiramente mais elevados de proteína que as amostras de sumo de framboesa, pelo facto dos espinafres serem mais ricos neste nutriente, registando 2,6g/100g de proteína enquanto a framboesa regista, apenas, 0,9g/100g (INSA).

4.3.7. Teor de minerais, oligoelementos e metais pesados

Diversos estudos têm demonstrado uma ampla gama no conteúdo mineral presente nas algas marinhas, não encontrada em plantas terrestres comestíveis. Este elevado teor em minerais está relacionado com fatores como o *phyllum* das algas, a sua origem geográfica e sazonal, tempo de residência no oceano, variações ambientais e fisiológicas (Mabeau & Fleurence, 1993; Rupérez, 2001).

Os minerais exercem inúmeras funções no corpo humano, desde mineralização óssea, regulação da pressão arterial, proteção contra o *stress* oxidativo, entre outros. As necessidades diárias, para seres humanos, podem variar entre alguns microgramas até níveis superiores a 1 g por dia (Mæhre, 2014).

Foram avaliados os teores de macromoléculas como cálcio (Ca), sódio (Na), potássio (K) e magnésio (Mg), nas diferentes amostras de sumo, visto serem os minerais que

estão presentes em quantidades significativas nas algas marinhas (Nisizawa, 2006 citado por Khairy and El-Sheikh, 2015).

De acordo com a Tabela 4.1, verifica-se um maior acréscimo de potássio e de sódio em ambos os sumos com a adição da alga *Gelidium corneum* em relação aos respetivos controlos. No entanto, embora as algas, em geral, apresentem teores relativamente mais elevados de sódio em comparação com os teores registados em vegetais terrestres, a razão Na/K calculada para os sumos com algas indica valores inferiores a 1,5 (0,053 para sf_a e 0,095 para se_a) (Rupérez, 2002).

Tabela 4.1 – Teor em minerais, oligoelementos e metais pesados [Ca, Na, K, Mg, Cu, Fe, Mn (mg/100ml) e I, Pb e Cd (µg/g)] das amostras de sumo de framboesa e de espinafres, para o t₃₀.

	sf_a	sf_c	se_a	se_c
Minerais				
Cálcio (Ca)	4,6	2,4	5,7	6,8
Sódio (Na)	10,0	3,0	20,0	10,0
Potássio (K)	190,0	81,0	210,0	160,0
Magnésio (Mg)	6,3	1,7	7,5	4,8
Oligoelementos				
Iodo (I)	0,36	<0,10	0,30	<0,10
Cobre (Cu)	0,009	0,008	0,008	0,013
Ferro (Fe)	0,076	0,063	0,074	0,16
Zinco (Zn)	0,012	0,006	0,024	0,034
Manganês (Mn)	0,033	0,026	0,058	0,069
Metais pesados				
Chumbo (Pb)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Cádmio (Cd)	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005

Estes resultados são interessantes, do ponto de vista nutricional, uma vez que a ingestão destes sumos com algas poderá ajudar a equilibrar a razão sódio/potássio, o que leva à manutenção do equilíbrio de fluidos corporais (Khairy and El-Sheikh, 2015). Por outro lado, a ingestão de altas taxas de Na/K tem sido relacionada com um aumento de incidência de hipertensão (El Din and El-Sherif, 2012; Rupérez, 2002).

A contrastar com os valores apresentados no presente estudo, estão alguns produtos alimentares típicos europeus, como as carnes, em geral, e as salsichas, que apresentam razões de Na/K entre 2,9 e 7,5 (Khairy and El-Sheikh, 2015).

Também se verifica um incremento em magnésio para as duas amostras de sumo com algas. Já os teores de cálcio aumentaram, apenas, na amostra de sumo de framboesa com algas, passando de 2,4 mg/100ml para 4,6 mg/100ml.

No que respeita aos oligoelementos analisados, verifica-se que todos sofrem um ligeiro aumento na amostra de sumo de framboesa com algas. No entanto, o sumo de espinafres com algas não sofre praticamente nenhuma alteração. Esta situação pode dever-se ao facto dos espinafres apresentarem um conteúdo mineral excecionalmente elevado (20,4%), semelhante ao conteúdo mineral das algas vermelhas (Rupérez, 2002).

Contudo, é de destacar o teor em iodo, que é considerado um dos principais elementos fornecidos pela ingestão de algas. Em comparação com as plantas terrestres e animais, que contêm apenas quantidades vestigiais de iodo (1 ppm), as algas marinhas apresentam altas concentrações deste nutriente (500–8,000 ppm) (El Din and El-Sherif, 2012). Analisando a tabela 4.1 constata-se que a adição da alga a ambos os sumos torna-os numa fonte de iodo, que era inexistente antes da sua adição (0,36 µg/g para a amostra sf_a e 0,30 µg/g para a amostra se_a). O iodo é essencial para a síntese de hormonas da tiroide, fundamentais na regulação do metabolismo, sendo que uma ingestão inadequada deste mineral pode levar ao desenvolvimento de distúrbios, tais como bócio e cretinismo. Uma estimativa realizada em 2003 afirma que 35,2% da população mundial revela uma ingestão insuficiente de iodo e que a prevalência de bócio é de 15,8% (Mæhre, 2014). O desenvolvimento de produtos alimentares com adição de algas marinhas, nomeadamente em sumos naturais, poderá dar um contributo importante, ao nível da saúde pública, para o alcance da dose diária recomendada deste nutriente, de 150 µg para adolescentes/ adultos e 200 µg para grávidas/ lactantes (WHO, 2011).

Todavia, para além de compostos desejáveis, as algas também concentram certos metais pesados, por vezes em níveis considerados superiores aos recomendados. As concentrações dos metais pesados dependem do meio circundante e as variações podem ser muito localizadas (Holdt and Kraan, 2011). No presente estudo, pode-se observar que tanto a amostra de sumo de framboesa como a de sumo de espinafres com a adição da alga *Gelidium corneum*, e respetivos controlos, apresentaram valores inferiores a 0,02 ppm para o chumbo e inferiores a 0,005 ppm para o cádmio, pelo que não se verifica a existência de risco de contaminação para o ser humano.

4.3.8. Teor de vitaminas

Regra geral, as algas apresentam uma grande variedade de antioxidantes, incluindo vitaminas e pigmentos que lhes servem de proteção contra a exposição solar direta em meio aquoso (Mabeau and Fleurence, 1993). Grande parte das algas vermelhas contêm quantidades importantes de provitamina A, vitaminas B1 e B2.

Por outro lado, o conteúdo em vitamina C é um parâmetro nutricional importante no caso dos sumos de fruta. Embora o sumo de maçã apresente uma baixa concentração de ácido ascórbico, industrialmente, é prática comum a sua adição, com o objetivo de inibir o escurecimento enzimático, provocado pela enzima polifenoloxidase (PPO) proporcionando, ao mesmo tempo, uma fonte adicional de vitamina C (Valdramidis *et al.*, 2009).

No que respeita ao teor vitamínico, foram avaliadas quatro vitaminas, nomeadamente, vitamina A, B1, B2 e C. os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Após a observação da tabela, constata-se que a atividade da vitamina A foi inferior a 50 µg de retinol/100 ml de amostra. Este valor é considerado baixo (<100 mg de retinol/100 g de porção edível) segundo a classificação adotada por Tee and Lim, 1991, citado por Norziah and Ching, 2000.

Quanto às vitaminas do complexo B, após observação da tabela supracitada, verifica-se que as amostras analisadas apresentam valores muito reduzidos de ambas as vitaminas. Assim, enquanto na amostra sf_c o teor de vitamina B1 é inferior a 0,010 mg/100 ml, a amostra sf_a apresenta 0,010 mg/100 ml. No caso das amostras de sumo de espinafres, não se registam praticamente diferenças entre se_a e se_c, com valores de 0,012 e 0,013, respetivamente.

Tabela 4.2. Teor vitamínico [Vitamina A (µg retinol /100 ml) e Vitamina B1, B2 e C (mg/100 ml)] presente nas amostras de sumo de framboesa e de espinafres, para o t₃₀.

	sf_a	sf_c	se_a	se_c
Vitaminas				
Vitamina A	<50,0	<50,0	<50,0	<50,0
Vitamina B1	0,010	<0,010	0,012	0,013
Vitamina B2	<0,010	<0,010	0,011	<0,010
Vitamina C	114,0	132,0	63,50	135,0

A vitamina B2 é inferior a 0,010 para ambas as amostras sf_a e sf_c, já nas amostras de sumo de espinafres, apresenta um ligeiro aumento para a se_a (0,011) em relação à amostra se_c (<0,010). No que respeita à vitamina C, verifica-se uma redução significativa entre as amostras de sumo controlo (sf_c e se_c) e as amostras de sumo com algas (sf_a e se_a). Dado que a vitamina C é altamente instável e sensível à oxidação, o processo de mistura e de filtração e o tempo de extração da alga poderão ter influenciado o teor final desta vitamina nas amostras de sumo com algas (Norziah and Ching, 2000).

4.4. Análises microbiológicas

Nas análises efetuadas ao longo do estudo, todos os sumos se apresentaram estáveis do ponto de vista microbiológico. Assim, em todas as datas em que foram analisados, após o processo de hiperpressão (no próprio dia de fabrico, ao fim de 15 e 30 dias de conservação sob refrigeração) nunca foi detetada a presença de *Salmonella spp.* (Neg./ 25 ml). Os resultados obtidos para a *Escherichia coli*, foram inferiores a 1 UFC/ml. No que respeita à contagem de bolores e leveduras, os resultados obtidos foram, maioritariamente, inferiores a 1×10^1 UFC/ml, havendo apenas duas réplicas, ao t_{15} , para sumo de espinafres com algas, com valores entre 30 e 70 UFC/ml.

Na Tabela 4.3 está apresentada a evolução microbiológica correspondente à contagem de microrganismos a 30 °C, no dia de fabrico, sem e com HPP, ao fim de 15 dias e 30 dias de conservação.

Verifica-se que todas as réplicas apresentam resultados satisfatórios, mesmo antes do processo de HPP, visto não se registarem valores superiores a 1×10^5 . Como se pode observar, após o processo de HPP, o tempo de armazenamento, não influenciou a evolução da carga microbiana, estando os valores compreendidos entre $1,17 \times 10^2$ UFC/ml (t_0) e $1,16 \times 10^2$ (t_{30}) para o sumo de framboesa com algas (sf_a) e $1,62 \times 10^2$ UFC/ml (t_0) e $9,2 \times 10^1$ (t_{30}) no sumo de espinafres com algas (se_a).

Tabela 4.3. Média da contagem de microrganismos totais a 30°C (UFC/g) para os dois tipos de sumo, ao longo do tempo de estudo.

Microrganismos totais a 30°C (UFC/g)		
Dias de análise	sf_a	se_a
t_0 , sem HPP	$1,72 \times 10^4$	$7,88 \times 10^4$
t_0 , com HPP	$1,17 \times 10^2$	$1,62 \times 10^2$
t_{15} , com HPP	$1,18 \times 10^2$	$1,21 \times 10^2$
t_{30} , com HPP	$1,16 \times 10^2$	$9,20 \times 10^1$

Os resultados das presentes análises contribuem para a caracterização destes dois produtos ao nível dos diferentes parâmetros microbiológicos, nomeadamente, na pesquisa de agentes patogénicos (*Salmonella spp.*) na contagem de indicadores de higiene (*Escherichia coli*) e de microrganismos tolerantes a meios ácidos (como é o caso dos bolores e leveduras), bem como na contagem de microrganismos a 30°C. É de salientar que, apesar deste último parâmetro não estar diretamente relacionado com a saúde do consumidor, ele reflete a qualidade da matéria-prima utilizada e as práticas

adotadas durante toda a cadeia de produção, nomeadamente, as condições de processamento, manuseamento e armazenamento.

4.5. Análise sensorial

A oferta de um produto alimentar adaptado a um determinado mercado alvo é resultado de um processo complexo de ideias, que têm por base, o estudo científico dos desejos do consumidor. Nesta abordagem, a análise sensorial revela-se um fator determinante, uma vez que permite medir atributos sensoriais dos produtos, determinar se o consumidor deteta diferenças nos produtos e se os mesmos são aceites, ou não, pelo consumidor (Giboreau *et al.*, 2004).

Tendo em conta a escassez da alga utilizada no fabrico dos sumos, uma vez que a sua apanha terminaria aquando do início deste trabalho, e que o objetivo principal desta análise foi medir o grau de aceitação das duas variedades deste novo produto, foi realizada somente uma prova, ao 29.º dia de fabrico dos sumos.

Nas Figuras 4.9 encontram-se traçados os perfis sensoriais das duas amostras.

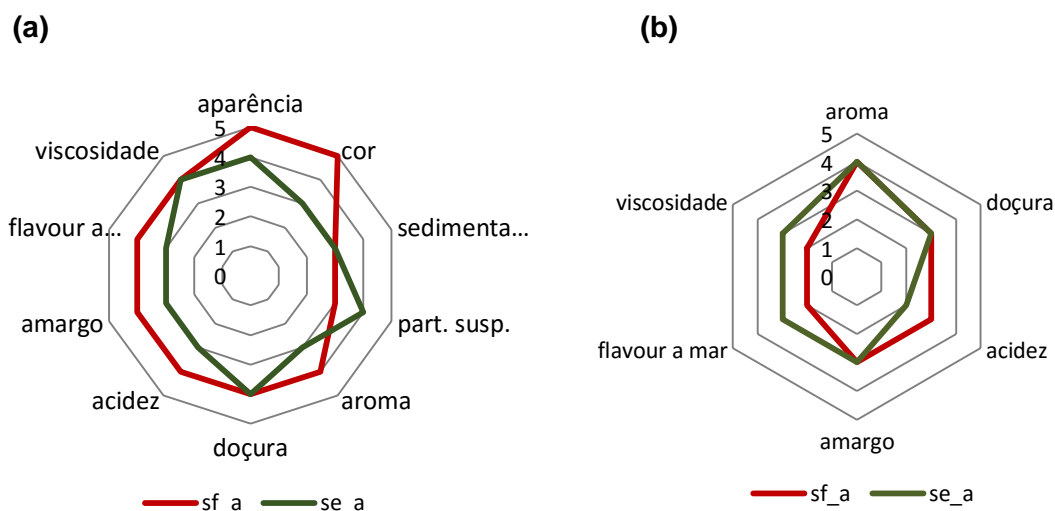


Figura 4.9 – Perfil Sensorial para as duas amostras, no que respeita à aceitabilidade **(a)** e a intensidade **(b)**.

(1 – Extremamente desagradável; 2 – Desagradável; 3 – Indiferente; 4 – Agradável; 5 – Extremamente agradável) **(a)**

(1 – Pouco intenso; 3 – Intensidade intermédia; 5 – Muito intenso) **(b)**

Após a análise dos gráficos, ao nível do parâmetro da aparência, constata-se que os resultados variam entre agradável (sumo de espinafres) e extremamente agradável (sumo de framboesa), o que indica uma boa aceitabilidade por parte dos provadores. Os

valores da avaliação da cor acompanham os valores da aparência no caso do sumo de framboesa, que apresenta uma cor extremamente agradável para os provadores. Já no caso do sumo de espinafres, este parâmetro foi avaliado como indiferente.

Estes resultados poder-se-ão dever ao facto dos sumos verdes serem um produto recente no mercado nacional, não estando o consumidor português tão familiarizado com este conceito.

Em meados de 2014, foram lançadas algumas variedades de sumos verdes, por parte da Frubaça, sendo 70% destes sumos exportados para o centro e norte da Europa, pelo facto destes mercados serem mais recetivos a este tipo de produtos (Freitas, 2014).

Quanto à sedimentação, ambas as amostras obtiveram um resultado intermédio (indiferente), não sendo este um parâmetro significativo nesta avaliação. O parâmetro das partículas em suspensão foi o único para o qual o sumo de espinafres apresentou uma maior aceitação, relativamente ao sumo de framboesa. Verifica-se que os dois sumos apresentam um sabor doce de intensidade intermédia e agradável. Quanto aos restantes parâmetros associados ao sabor, nomeadamente, a acidez e o sabor amargo, o sumo de framboesa apresentou maior aceitabilidade, registando um grau de acidez um pouco mais intenso em relação ao sumo de espinafres. No que respeita ao *flavour* a mar, verifica-se que a sua aceitabilidade é maior no sumo onde este parâmetro apresenta menor intensidade (sumo de framboesa). Constatou-se que ambos os sumos apresentam um aroma intenso, embora o sumo de framboesa obtenha resultados mais aceitáveis.

Foram incluídas duas questões de carácter hedónico. A primeira teve como objetivo avaliar o grau de aceitação global das amostras e a segunda pretendeu avaliar a intenção de compra das amostras por parte dos consumidores.

No que respeita à aceitação global dos produtos, de acordo com a Figura 4.10, é possível verificar que o sumo de framboesa foi o que apresentou maior preferência global por parte dos provadores. Cerca de 86% destes, consideraram o sumo de framboesa agradável e extremamente agradável. Já o sumo de espinafres obteve, apenas 31% de aceitação global, sendo que uma grande parte dos provadores (45%) não deram uma resposta conclusiva, mostrando-se indiferentes.

É de notar que entre os dois sumos existe uma diferença na percentagem de alga adicionada, sendo que o sumo de espinafres contém o dobro da percentagem de alga comparativamente com o sumo de framboesa. Para além desta diferença, acresce o facto da espécie *Gelidium corneum* apresentar um sabor intenso e das provas terem sido realizadas perto do fim do prazo de validade das amostras (ao 29.º dia de produção).

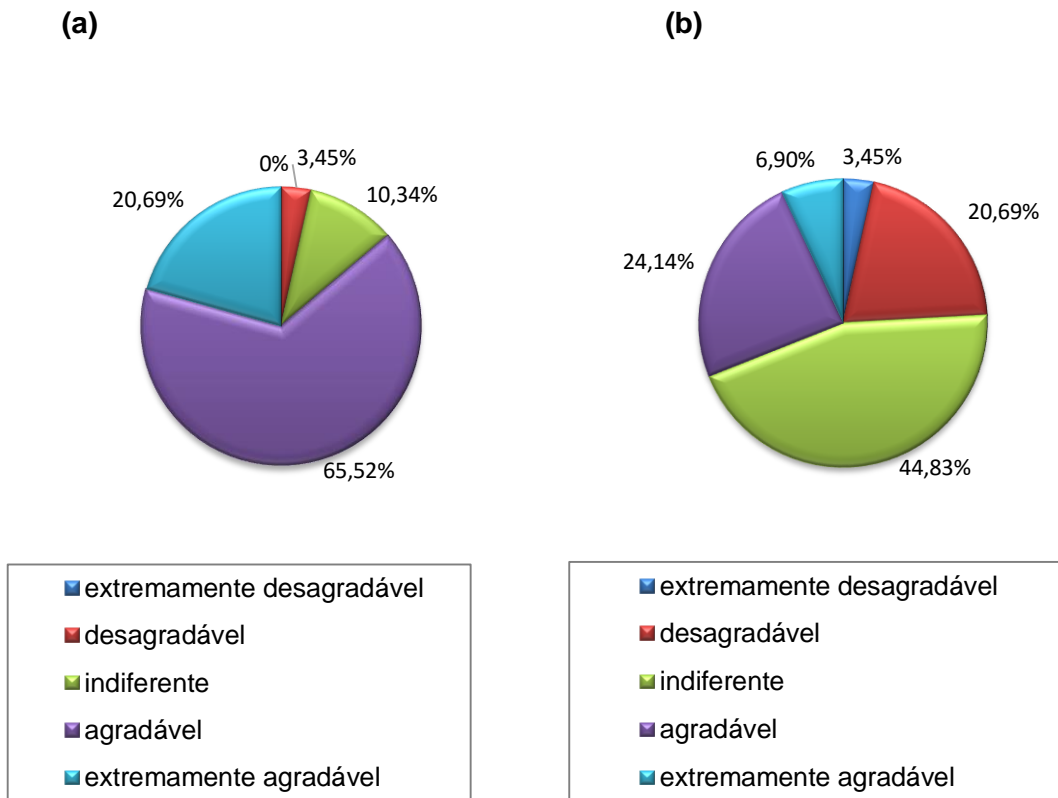


Figura 4.10 – Grau de aceitação global das amostras para o sumo de framboesa (a) e sumo de espinafres (b).

Quanto à intenção de compra, verifica-se, pela Figura 4.11, que 93% dos provadores comprariam os sumos com algas.

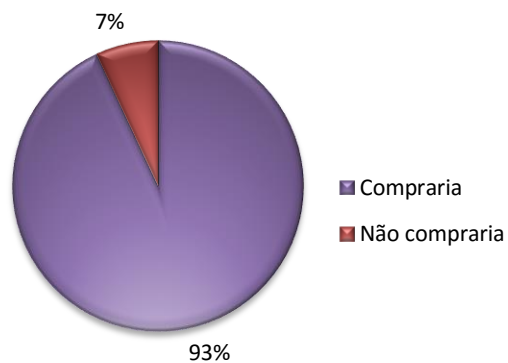


Figura 4.11 – Intenção de compra dos dois produtos.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Entre as principais características de qualidade dos sumos de fruta, destacam-se a cor, o grau de turbidez e o valor nutricional. Os parâmetros nutricionais mais relevantes são a capacidade antioxidante total, as antocianinas, presentes nos sumos vermelhos e o conteúdo de vitamina C (Valdramidis *et al.*, 2009).

Relativamente à cor, conclui-se que a adição do extrato de algas influencia todos os parâmetros CIELab das amostras de sumo de espinafres (com e sem algas) e o parâmetro a^* das amostras de framboesa. As amostras de sumo de framboesa com algas, ao longo dos 30 dias, não apresentam diferenças significativas no parâmetro a^* , sendo que, para o parâmetro b^* , as amostras de framboesa e de espinafres, com algas, demonstram maior estabilidade em relação aos respetivos controlos. No geral, pode-se concluir que os sumos de framboesa com algas são mais estáveis, em relação aos parâmetros da cor, que os de espinafres.

Quanto ao teor de vitamina C, ao fim de um mês de armazenamento, verifica-se uma redução significativa em ambos os sumos com algas, apontando como causas principais, a introdução de oxigénio, provocada pelo processo de mistura e de filtração bem como o tempo de extração da alga.

No que respeita à capacidade antioxidante, confirma-se que todas as amostras apresentam valores bastante elevados, superiores a 90%. Apesar das amostras de sumos com algas apresentarem uma ligeira redução da capacidade antioxidante, em relação aos seus controlos, estes valores parecem ser suficiente para estabilizar o parâmetro b^* da cor.

Os valores de pH apresentam ligeiras reduções, ao longo do tempo de armazenamento, para todos os sumos e verifica-se que a adição do extrato de algas promove um ligeiro aumento de pH em relação aos sumos controlo. Os valores de TSS mostraram-se estáveis, sendo muito superiores nas amostras de sumo com algas.

Quanto ao teor em minerais, verifica-se que o extrato de algas aumentou o teor de sódio, potássio, magnésio e iodo, nos sumos, sendo este último de especial importância, já que se confirma a sua deficiência em populações de risco em Portugal, nomeadamente em grávidas e lactantes.

Através da análise sensorial, constata-se que, em comparação com o sumo de espinafres, o sumo de framboesa com algas apresenta maior aceitabilidade, tanto a nível global, como a nível dos diferentes descritores. No que diz respeito à intenção de compra, 93% dos provadores comprariam estes produtos. Deste modo, verifica-se que os sumos de fruta com algas poderão constituir uma alternativa, a nível de mercado, em relação aos sumos convencionais.

Como perspectivas futuras, seria essencial a realização das restantes análises nutricionais, nomeadamente, o teor de polifenóis totais, o teor de fibra e a quantificação dos diferentes pigmentos, entre eles, as clorofilas e os carotenoides. O desenvolvimento deste estudo, bem como a realização de formulações com outras espécies de algas, seria de grande interesse para uma melhor compreensão da interação dos compostos bioativos, existente na matriz alimentar.

Seria, também, interessante proceder-se à otimização de certas etapas, nomeadamente, à homogeneização em atmosfera inerte (azoto) ou mistura em vácuo, de forma a deslocar o oxigénio dissolvido, que contribui para a auto-oxidação da vitamina C.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, D. e Pintado, M. (2008). *Caracterização nutritiva e funcional de variedades de maçã de Alcobaça*. Relatório final. Departamento de Biotecnologia e Química Fina. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa, Porto. 28 pp.

Almeida, A. (2007). *Guia de Campo das Algas do Interdital da praia da Vigia*. Guia elaborado no âmbito da dissertação de mestrado em Biologia e Geologia, Especialização em Educação. Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente. Universidade do Algarve. 130 pp.

Associação dos Produtores de Maçã de Alcobaça. Acedido a 30 de maio de 2015. Disponível em: <http://www.maca.pt/>.

Bala, V.M. (2008). Preserving foods through high-pressure processing. *Food technology*. 32-38.

Barba, F.J., *et al.* (2012). High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11**: 307–322.

Barbosa-Cánovas, G.V. and Juliano, P. (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. In: Gutiérrez-López, G.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Parada Arias, E., editors. *Food engineering: Integrated approaches*. New York: Springer, 9-46.

Baron, A. (2006). High-pressure treatment of cloudy apple juice. *LWT - Food Science and Technology*. **39**:1005–1013.

Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRS Press. New York.

Böhm, V. and Schlesier, K. (2004). *Methods to evaluate the antioxidant activity. production practices and quality assessment of food crops*. Eds. Springer. Netherlands.

Bull, M.K. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **5**:135–149.

Burtin P. (2003). Nutritional value of seaweeds. *Elec J Environ Agric Food Chem*. 2(4).

Camarinha, S. (2014, 15 de junho). Frubaça: a maçã em estado líquido. *Diário de notícias*. pp 32-33.

Cardoso, S., *et al.* (2014). Bioproducts From Seaweeds: A Review With Special Focus On The Iberian Peninsula. *Current Organic Chemistry*. **18**(7):1-55.

Chawla, R., et al. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 48(3):260–268.

Chinnici F et al. (2004). Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(15):4684-9.

Choi, S. E. (2013). Sensory Evaluation. In: Sari Edelstein (ed.). *Food Science: An Ecological Approach*. 1st edition, Jones and Bartlett Learning LLC. New York.

Cipriano, C. (2011, 19 de agosto). Frubaça – Como um armazém de fruta de Alcobaça se transforma numa empresa de alta tecnologia. *Gazeta das Caldas*. Acedido em: 15 de maio, 2015. Disponível em: <http://www.gazetacaldas.com/14233/frubaca-como-um-armazem-de-fruta-de-alcobaca-se-transforma-numa-empresa-de-alta-tecnologia/>

CODIMACO (2015). Guia para a Avaliação e Certificação da Maçã de Alcobaça – IGP e Suas Novas Formas de Apresentação. Acedido a 30 de maio de 2015. Disponível em: <http://www.codimaco.pt/guias/GuiaMaca.pdf>

Cofrades, S. (2013). Design of healthier foods and beverages containing whole algae. In: Dominguez, H. (ed.). *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Elsevier. 609- 633.

Copa (2012). Acedido a 30 de Maio de 2015. Disponível em: www.copa.pt

COTHN (2008). Acedido em 5 de Janeiro de 2015. Disponível em: <http://cothn.pt/portal/index.php?id=6740>

Cunha, A., et al. (2006). *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 31-52.

Dawes, C.J. (1998). *Marine Botany*. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 480.

Deliza, R. (2005). Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *Journal of Food Engineering*. **67**: 241–246.

Derner R., et al. (2006). Microalgae, products and applications. *Ciência Rural*, 36:1959-1967.

Despacho nº 3522/2012 de 9 de março. *Diário da República nº 50/ 2012 Série II*. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.

Dhargalkar, V.K. (2014). Uses of seaweeds in the indian diet for sustenance and well-being. *Science and Culture*. **80**:192-202.

Direção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural. (2015). *Caderno de especificações. Maçã de Alcobaça – Indicação Geográfica Protegida*. Acedido em 30 de maio de 2015. Disponível em:

http://www.dgadr.mamaot.pt/images/docs/val/dop_igp_etg/Valor/CE_Maca_Alcobaca_No_v2013_v2.pdf

Duda-Chodak, A., *et al.* (2010). The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(2): 39-50.

Enrique P., *et al.* (2007). High-Pressure Treatment in Food Preservation. In: M. Shafiur Rahman (Ed.). *Handbook of Food Preservation*, Second edition, CRC Press. 815-854.

EUFIC (2014). *EU project Connect4Action*. Disponível em: http://www.eufic.org/article/en/artid/Connecting_key_players_in_the_food_innovation_process_to_improve_consumer_acceptance_of_new_products/

Freitas, C. (2011). *Avaliação da atividade anti-inflamatória de um extrato de framboesa na Artrite Reumatóide*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. 98 pp.

Freitas, S. (2014, 16 de junho). Sumos portugueses feitos com tecnologia da NASA são sucesso no estrangeiro. *Jornalismo Porto net*. Acedido em: 22 de maio de 2015. Disponível em: <http://jpn.up.pt/2014/06/16/sumos-portugueses-feitos-com-tecnologia-da-nasa-sao-sucesso-no-estrangeiro/>

Giboreau, A. *et al.* (2004). Le profil sensoriel: Un outil au service du marketing. *Revue Française Du Marketing*. **196**:1-5.

Gómez, P., *et al.* (2011). Hurdle Technology in Fruit Processing. *Annual Rev. Food Sci. Technol.* **2**:447-465.

Gruenwald, J. (2009). Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology*. **27**: 210–216.

Grupo Marktest (2009) – Comportamento do Consumidor. Disponível em: <http://www.marktest.com/wap/a/n/id~12cc.aspx>. Acedido a 15 de julho de 2015.

Health Canada's Food Directorate, (2014). High Pressure Processing (HPP)-treated Fruit and Vegetable-based Juices. *International Food Risk Analysis Journal*. **4**:18.

Heinz, V., Buckow, R., (2009) Food preservation by high pressure. *J. Verbr. Lebensm.* **5**:73–81.

Herrero, M., *et al.* (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food chemistry*. 1-34.

Holdt, S. L., Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*. **23**:543-597.

Iberagar (2010). Agar-agar – Poderoso Espessante e Gelificante Natural. Acedido em 2 de junho de 2015. Disponível em: www.revista-fi.com.

INETI – Departamento de tecnologia de indústrias alimentares. (2007). Estudo da caracterização nutricional e de fitonutrientes em variedades de maçã do Oeste. Lisboa.

INSA (2010). Acedido em 2 de julho. Disponível em: <http://www.insa.pt/>.

Jahn, R. & Kusber, W.H. (2002). AlgaTerra Information System. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin. Disponível em: <http://www.algaterra.org>

Jornal de Leiria (2011). Sumos e polpas da Frubaça encantam Europa. p. 23.

Keenan, D. F. *et al.* (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*; **45**: 50-57.

Khairy, H., and El-Sheikh, M. (2015). Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 1-8.

Knorr, D., *et al.* (2011) Emerging technologies in food processing. *Annual Reviews Food Science Technology*; **2**: 203-235

Kuda, t. *et al.* (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*; **18**: 625–633.

Lee, R. (2008). Phycology. Fourth edition. Cambridge University Press. USA.

Lima, G. (2012). Pigmentos e teor de água em espinafres orgânicos e convencionais. *Horticultura Brasileira*; **30**: S7353-S7357.

Mæhre, H. K. *et al.*, (2014). Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of Science and Food Agriculture*; **94**: 3281–3290.

Maia, P. Entrevistado por Soares, M. (2008). Frubaça – O Sucesso e a Excelência da Maça de Alcobaça. Revista da APH, 93, Abril/Maio/Junho de 2008. Acedido em: 5 de janeiro de 2015, Disponível em: http://www.aphorticultura.pt/PDF/revistas/93/revistaaph93_entrevista.pdf

Mathys, A.M. (2008) Inactivation mechanisms of *Geobacillus* and *Bacillus* spores during high pressure thermal sterilization. *Technischen Universitat Berlin*, v. 177.

Mchugh D.J. (2003) A Guide to the Seaweed Industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm>

Melo, R. A. (2002). Exploração dos Recursos Algológicos em Portugal. In Martins-Loução (coord.), *Fragmentos em Ecologia*, FCUL, Livraria Escolar Editora, pp. 45-65.

Nagai, T. e Yukimoto, T. (2003). Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chemistry*. **81**:327–332.

NERSANT – Associação empresarial do Ribatejo (2011). Tecnologia de alta pressão HPP (High Pressure Processing). Tecnologias disponíveis nos cinco setores chave da Região do Ribatejo, pp. 12-13.

Norton, T. and Sun, D.W. (2008) Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food Bioprocess Technology*, 1:2-34.

Norziah, M. and Ching, C. (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry*, **68**: 69-76.

NP EN 1132:1996. Sumos de frutos e de produtos hortofrutícolas. Determinação do valor do pH. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.

NP EN 12141:1999. Sumos de frutos e de produtos hortofrutícolas. Determinação do teor de sólidos solúveis. Método refractométrico. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.

O'Carra, P. (1980). The Native Forms of the Phycobilin Chromophores of Algal Biliproteins. *Biochem. J.* **187**: 303-309

Oey, I. *et al.* (2008). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?. *Trends in Food Science & Technology*. **19** (2008) 300-308.

Paiva, L., *et al.* (2014). As macroalgas marinhas dos Açores e o seu valor nutricional. *Série 2*, nº 5. 19-21.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., e Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*. 76: R6-R15.

Patarra, R., *et al.* (2014). Cultivo de macroalgas nos Açores. Oportunidades e desafios. *Boletim de Biotecnologia*. Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. *Série 2*, nº 5. 16-18.

Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*. **98**(6), 1400-1409.

Pereira, L. (2007). *As Algas Marinhas e Respetivas Utilidades*. Departamento de Botânica Universidade de Coimbra. Disponível em: <http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/1desafio/algas-marinhas-utilidades.pdf>

Pereira, L. (2009). Guia Ilustrado das Macroalgas – IMAR – MACOI – Universidade de Coimbra.

Pereira, L. (2010). *Algas: Os seus usos na agricultura, indústria e alimentação*. Câmara Municipal de Viana do Castelo. Viana do Castelo. 1-72.

Pereira, L. (2011) A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds. In: *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medical Uses*, ed. Pomin, V. H., 15-47. Nova Iorque: Nova Science Publishers Inc.

Periquito, J. (2014). Inovação na Agricultura Agro-indústria e Floresta. Acedido em 5 de janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.premioinovacao.pt/wp-content/uploads/2014/04/Apresentacao-JorgePeriquito.pdf>.

Plaza, M. et al. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*. **19**: 31-39.

Portuguese Seaweeds Website – MACOI (2008). Acedido em 16 de junho de 2015. Disponível em: <http://macoi.ci.uc.pt/>

Probep (Associação Portuguesa das Bebidas Refrescantes Não-alcoólicas). *Mercado e estatísticas*. Acedido em julho 2015, em: <http://www.probeb.pt>.

Rastogi, N. K., et al. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **47**: 69-112.

Rastogi, N. K. (2013). Recent Developments in High Pressure Processing of Foods. In: Hartel, R. W. (Ed.). *SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*. Springer. New York.

Rosa, A. and MIRA Godinho, M. (2013). Mudanças culturais, institucionais e tecnológicas em Portugal, um estudo de caso de Inovação em sumos de frutas. *Revista Iberoamericana de Ciência, Tecnologia y Sociedad – CTS*, **8** (24), 251-264.

Rupérez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry* **79**:23–26.

Sampedro, F. et al. (2010). High hydrostatic pressure processing of fruit juices and smoothies: research and commercial application. In: Doona, C. J. et al (editors). *Case Studies in Novel Food Processing Technologies*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge.

Santelices, B. (1988). Synopsis of biological data on the seaweed genera *Gelidium* and *Pterocladia* (Rhodophyta). *FAO Fisheries Synopsis* 145: 55.

Santos, R., e Duarte, P., (1991). Marine plant harvest in Portugal. *Journal of Applied Phycology*. **3**: 11-18.

Seaweed Industry Association. (2014). Disponível em: <https://seaweedindustry.com/seaweed/type/gelidium-corneum>.

Shukla, Y. (2007). Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*. **45**:683–690.

Silva, R. (2014, 6 de março). Sumos verdes, a mais recente inovação da Frubaça. *Jornal de Leiria*. pp. 25.

Simões, S. (2011, 27 de novembro). Das refeições feitas ao sumo 100% natural mas doce. *Diário de notícias*. Acedido a 18 de dezembro de 2014. Disponível em: http://www.dn.pt/inicio/economia/interior.aspx?content_id=2151258&page=-1

Sumos: um mercado em movimento. (2007, 20 de abril). *Hipersuper*. Acedido a 13 de julho de 2015. Disponível em: <http://www.hipersuper.pt/2007/04/20/sumos-um-mercado-em-movimento/>

Tao, Y. et al. (2005). High pressure processing of foods: an overview. In: Sun, Da-Wen (editor). *Emerging Technologies for Food Processing*. Second edition. Elsevier, Dublin. 3-32.

The Seaweed Site: information on marine algae. (2000-2015). Acedido em 1 de junho de 2015. Disponível em: http://www.seaweed.ie/descriptions/Saccorhiza_polyschides.php

Timmermans, R.A.H., *et al.* (2001). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

Tomaselli, L. (2004). The microalgal cell. In: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science. Oxford. 3-19.

Urrutia-Benet, G. (2005). High-pressure-low-temperature processing of foods: Impact of metastable phases of process and quality parameters. PhD thesis, Berlin University of Technology.

Vaikousi, H., Koutsoumanis, K., Biliaderis, C. (2008) Kinetic modeling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions. *Food Chemistry*, **107**: 785-796.

Wang, R., *et al.*, (2013). Post-effects of high hydrostatic pressure on green color retention and related properties of spinach puree during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **17**: 63–71.

Whitehead, J., (2005). Functional drinks containing herbal extracts. In: Ashurst, P. (ed.). *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*. Blackwell publishing. UK. 300-335.

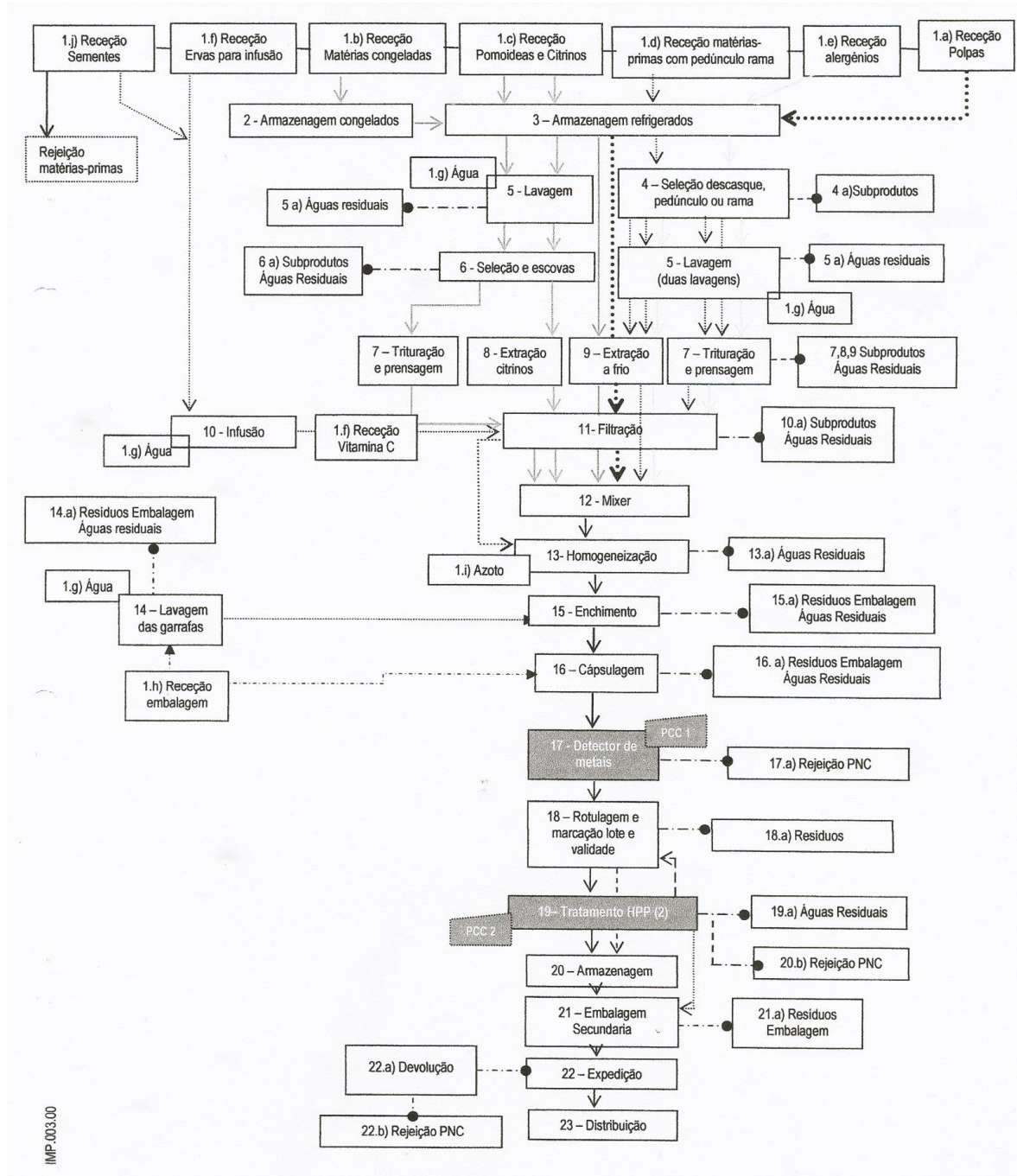
WHO. Healthy Food and Nutrition for Women and Their Families. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2001. 22-39.

Yildiz, G., *et al.* (2014). Comparison of the antioxidative components of some marine macroalgae from turkey. *Pak. J. Bot.*, 46 (2): 753-757.

7. ANEXOS

Anexo I – Fluxograma de elaboração dos sumos por HPP

Tabela 7.1 – Fluxograma de elaboração dos sumos por HPP, na empresa Frubaça.



Anexo II – Método utilizado na determinação do teor de fibra alimentar total

O procedimento efetuado incluiu as etapas a seguir descritas:

Digestão enzimática:

Pesou-se, em duplicado, 1g de amostra seca e moída, com a aproximação de 0,1 mg, que se transferiu para um copo de 400 mL ao qual se adicionou tampão fosfato (pH 6,0). Ajustou-se, sempre que necessário, o valor de pH a $6,0 \pm 0,2$. Adicionou-se 0,1 mL de α -amilase termoestável. Em seguida os copos foram tapados com folha de alumínio e colocados num banho de água termostatizado (Memmert) a uma temperatura entre os 95°C e 100°C durante 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. Após arrefecimento, até à temperatura ambiente, procedeu-se ao ajuste do valor de pH a $7,5 \pm 0,2$ por adição da solução de NaOH 0,275N e adicionou-se 0,1 mL a solução de protease previamente preparada (100 μ L de uma solução a 5% (m/v) de protease em tampão fosfato). Taparam-se, novamente, os copos com folha de alumínio e incubou-se durante 30 minutos a 60°C com agitação contínua. Arrefeceu-se a solução, adicionou-se 10 mL da solução de HCl (0,325M) e mediu-se o pH, tendo sido feito o ajuste de modo ao pH final ser 4,0-4,6. Adicionou-se 0,3 mL de amiloglucosidase, taparam-se os copos com folha de alumínio e incubou-se durante 30 minutos a 60°C, com agitação contínua.

Por último, adicionou-se 280 mL de etanol 95% pré-aquecido a 60°C e deixou-se precipitar à temperatura ambiente durante 60 minutos.

Filtração e lavagem

Pesou-se, com a aproximação de 0,1 mg, um cadinho de placa filtrante com porosidade 2, previamente lavado e incinerado em mufla durante 1h a 525°C, contendo cerca de 0,5g de celite, e redistribuiu-se a mesma no cadinho com etanol 78%. Aplicou-se vácuo, com o auxílio de uma bomba de vácuo (Edwards High Vacuum, England) de modo a secar a celite sobre a placa porosa do cadinho. Mantendo o vácuo, transferiu-se quantitativamente o precipitado da digestão enzimática da amostra para o cadinho. O resíduo resultante da filtração foi sucessivamente lavado com três porções de 20 mL de etanol 78%, duas porções de 10 mL de etanol 95% e duas porções de 10 mL de acetona.

Secagem do resíduo e pesagem

Procedeu-se à secagem do resíduo contido no cadinho, em estufa (Memmert), a 105°C até massa constante. Após arrefecimento em exsiccador, pesou-se o cadinho com o resíduo e a celite, com a aproximação de 0,1mg, para determinar a massa do resíduo.

Determinação da proteína e da cinza da amostra

Para o cálculo da fibra total é necessário conhecer o conteúdo em proteína e em cinza do resíduo de cada amostra, cuja determinação foi realizada conforme a seguir se refere. A determinação da proteína foi efetuada num dos resíduos dos duplicados de cada amostra pelo método de Kjeldahl, usando 6,25 como fator de conversão do teor de N em proteína. O outro resíduo, dos duplicados de cada amostra, foi usado na determinação da cinza, para o que foi incinerado em mufla a 525°C durante 5h e, de seguida, seco em exsiccador e pesado com a aproximação de 0,1mg.

Cálculo do teor de fibra alimentar total

O teor de fibra alimentar total referente à matéria seca foi calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Teor de fibra total} = \frac{mR - mP - mA - mB}{m} \times 100$$

Anexo III – Ensaios/Métodos utilizados na avaliação microbiológica das amostras dos sumos de fruta com algas


Tabela 7.2. – Ensaios e respetivos métodos de avaliação microbiológica realizados às amostras dos sumos de fruta com algas. (adaptado de documento de análises microbiológicas realizado pelo laboratório Globalab).

Ensaio/Método	Unidades	VMR	VMA
Contagem de Microrganismos totais a 30 °C ISO 4833-1:2013	ufc/mL		
Contagem de Escherichia coli ISO 16649-2:2001	Ufc/mL	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³
Pesquisa de Salmonella spp ISO 6579:2002	-		Ausência em 25 ml
Contagem de Bolores ISO 21527:2008	ufc/mL		
Contagem de Leveduras ISO 21527:2008	ufc/mL		

VMR – Valor Máximo Recomendado

VMA – Valor Máximo Admitido

Anexo IV – Folha de Prova Sensorial

	Tese de Mestrado “Desenvolvimento de um novo produto: sumo natural com adição de algas”
Prova nº 1	Folha de prova

Nome: _____ Data: _____

AMOSTRA: A

1 – Avalie a amostra que está disponível no seu tabuleiro de prova e assinale na tabela qual a aceitabilidade e intensidade atribuída a cada um dos atributos considerados. Na escala de avaliação da aceitabilidade o valor de 1 corresponde a “Extremamente desagradável”, 3 corresponde “indiferente” e 5 corresponde a “extremamente agradável”. Na escala de avaliação da Intensidade o valor de 1 corresponde a “pouco intenso”, 3 corresponde “intensidade intermédia” e 5 corresponde a “extremamente intenso”.

	Aceitabilidade					Intensidade				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aparência	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Cor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Sedimentação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Partículas em suspensão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Aroma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doçura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Amargo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Flavour a produtos do mar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Viscosidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2- Avalie o grau de aceitação global da amostra que está disponível no seu tabuleiro de prova. Na escala de avaliação o valor de 1 corresponde a “Extremamente desagradável”, 3 corresponde “indiferente” e 5 corresponde a “extremamente agradável”.

1	2	3	4	5
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Observações:

AMOSTRA: B

1 – Avalie a amostra que está disponível no seu tabuleiro de prova e assinale na tabela qual a aceitabilidade e intensidade atribuída a cada um dos atributos considerados. Na escala de avaliação da aceitabilidade o valor de 1 corresponde a “Extremamente desagradável”, 3 corresponde “indiferente” e 5 corresponde a “extremamente agradável”. Na escala de avaliação da Intensidade o valor de 1 corresponde a “pouco intenso”, 3 corresponde “intensidade intermédia” e 5 corresponde a “extremamente intenso”.

	Aceitabilidade					Intensidade				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aparência	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Cor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Sedimentação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Partículas em suspensão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Aroma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doçura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Amargo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Flavour a produtos do mar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Viscosidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2- Avalie o grau de aceitação global da amostra que está disponível no seu tabuleiro de prova. Na escala de avaliação o valor de 1 corresponde a “Extremamente desagradável”, 3 corresponde “indiferente” e 5 corresponde a “extremamente agradável”.

1	2	3	4	5
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Observações:

3- Indique por favor a sua amostra preferida:

Amostra A	Amostra B
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4- Se estes produtos existissem à venda, compraria?

Sim	Não
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo.
Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a prova.**

Obrigada pela sua colaboração!

Anexo V – Imagens ilustrativas da Prova Sensorial aplicada aos dois sumos



Figura 7.1 – Tabuleiro com as duas amostras de sumo para Prova Sensorial. Da esquerda para a direita: sumos de framboesa com algas (sf_a) e sumo de espinafres com algas (se_a).



Figura 7.2 – Entrega dos tabuleiros, junto dos gabinetes de prova, com as respetivas amostras para Prova Sensorial.



Figura 7.3 – Preenchimento da Folha de Prova Sensorial por parte de uma provadora.