



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2017

**CATARINA ISABEL  
DA SILVA MARÇAL**

**EXPLORAÇÃO DE EXTRATOS DAS MACROALGAS  
*FUCUS VESICULOSUS* E *GRACILARIA* SP. PARA  
INGREDIENTE ALIMENTAR**





Catarina Isabel  
da Silva Marçal

## Exploração de extratos das macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria* sp. para ingrediente alimentar

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Cardoso, Equiparada a investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação científica do Doutor Artur Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA e ao grupo ReSyNa pela FCT, União Europeia, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE)

Projeto de investigação e desenvolvimento tecnológico em copromoção POCI-01-0247-FEDER-003419, SHARP – Seaweed for Healthier Traditional Products, co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Temático Competitividade e Internacionalização, no âmbito do Programa “Portugal 2020”



## **o júri**

Presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira  
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos  
Professora Adjunta, Instituto Politécnico de Castelo Branco

Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso  
Equiparada a Investigadora Auxiliar, Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

À Doutora Susana M. Cardoso, orientadora, pela oportunidade de poder realizar este trabalho, por ter sempre os “5 minutos” de disponibilidade, ensinamentos transmitidos e boa disposição.

Ao Professor Doutor Artur Silva, co-orientador, pela disponibilidade e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Ana Sofia, Marcelo Dias, Rodrigo Neto, Ana Rita, Andreia Silva e Valentina Pinheiro por toda a disponibilidade, apoio, ajuda, companheirismo e momentos de boa disposição.

À empresa Irmãos Monteiro, SA., e em particular ao Eng. Daniel Gomes pela importante colaboração.

Aos meus pais e à minha irmã por serem desde sempre o suporte e nunca me deixarem cair.





## palavras-chave

Extratos de macroalgas, antioxidantes, composição nutricional, alheira vegetariana, *Fucus vesiculosus*, *Gracilaria* sp., bioatividade

## resumo

As macroalgas são uma fonte rica e equilibrada de nutrientes e fitoquímicos bioativos associados à prevenção de diversas doenças. Embora o consumo direto de macroalgas na Europa seja ainda muito insípido quando comparado com os países asiáticos, as indústrias alimentares mostram um crescente interesse em introduzir as macroalgas como ingrediente funcional em diversos produtos, antevendo-se um aumento significativo da inclusão de macroalgas nos hábitos alimentares nos países europeus.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a potencialidade de extratos das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria* sp. para utilização como ingrediente de alimentos e/ou suplementos. Para tal, foram preparados extratos aquosos (temperatura ambiente ou a 90°C), acetona a 70% e etanol a 80%, que foram avaliados quanto ao seu teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (radical livre 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>), poder antioxidante redutor férrico (FRAP) e co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico (β-caroteno)), capacidade de inibição de enzimas chave do metabolismo de carboidratos (α-glucosidase, α-amilase) e de lípidos (lipase), bem como quanto ao seu valor nutricional no que respeita ao conteúdo em proteína, cinzas, fibra e açúcares.

O extrato de etanol a 80% da *F. vesiculosus* apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais (5,7±0,3 g de equivalentes de ácido gálico/100g de extrato), e maior potencialidade nos ensaios de DPPH<sup>\*</sup> (IC<sub>50</sub>= 99±7,2 µg/mL), FRAP (EC<sub>50</sub>= 0,29±0,03 mg/mL) e β-caroteno (IC<sub>50</sub>= 19,71±6,80 µg/mL). Por outro lado, no geral os extratos não mostraram grande potencial inibitório das enzimas em foco, com exceção do extrato de acetona a 70% da *F. vesiculosus* que apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 0,032 mg/mL para a α-glucosidase. Em termos de valor nutricional, o extrato de água à temperatura ambiente da *Gracilaria* sp. revelou teores elevados de proteína (19±0,1%), cinza (55,9±1,0%) e fibra solúvel (14,9±0,8%). Por outro lado, os extratos de água quente e água à temperatura ambiente da *F. vesiculosus* apresentaram teores elevados de açúcares totais (13,8±2,1%) e fibra solúvel (17,2±0,7%), respetivamente.

Os extratos aquosos da *F. vesiculosus* foram utilizados como ingredientes na formulação de alheiras vegetarianas numa percentagem de 0,4% (m/m peso húmido). As alheiras foram analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estado de oxidação pelos métodos Folin-Ciocalteu, Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>\*\*</sup>) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), respetivamente, bem como quanto aos seus conteúdos proteicos, cinzas, ácido láctico e pH, parâmetro de cor e

análise sensorial. Os resultados obtidos indicaram não existirem diferenças significativas entre as alheiras contendo o extrato de macroalga e a formulação base da alheira (controle), à exceção da análise de cor em que a incorporação do extrato fez diminuir o parâmetro  $L^*$  quando comparado com a alheira controle.

## keywords

Seaweed extract, antioxidants, nutritional composition, vegetarian “alheira”, *Fucus vesiculosus*, *Gracilaria* sp., bioactivity

## abstract

Macroalgae are a rich and balanced source of bioactive nutrients and phytochemicals, associated with the prevention of various diseases. Although their direct diet consumption in Europe is still very low when compared to Asian countries, food industries have shown a growing interest in introducing macroalgae as a functional ingredient in diverse products, thus contributing to the increment of macroalgae in food habits in the European countries.

The aim of this work was to evaluate the potential of macroalgae *F. vesiculosus* and *Gracilaria* sp. extracts as a food ingredient and/or supplements. *F. vesiculosus* and *Gracilaria* sp. extracts were produced with water (at room temperature or at 90°C), 70% acetone and 80% ethanol. The extracts were evaluated for their total phenolic compounds content, antioxidant activity ((2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH<sup>•</sup>), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and co-oxidation of β-carotene/linoleic acid (β-carotene)), inhibition capacity of key enzymes of carbohydrate metabolism (α-glucosidase, α-amylase) and lipids (lipase), as well as their nutritional value in relation to the content of protein, ash, fiber and sugars.

The 80% ethanol extract of *F. vesiculosus* was the most promising one with respect to the content of total phenolic compounds (5.7 ± 0.3 g of gallic acid equivalents / 100 g of extract), and antioxidant activity in DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 99 ± 7.2 µg / mL), FRAP (EC<sub>50</sub> = 0.29 ± 0.03 mg / mL) and β-carotene (IC<sub>50</sub> = 19.71 ± 6.80 µg / mL) assays. Furthermore, the extracts did not show significant inhibitory potential of the enzymes in focus, with exception of the *F. vesiculosus* 70% acetone extract which showed an IC<sub>50</sub> of 0.032 µg/mL towards the activity of α-glucosidase. Concerning the nutritional value, the room temperature water extract of *Gracilaria* sp. showed high levels of protein (19 ± 0.1%), ash (55.9 ± 1.0%) and soluble fiber (14.9 ± 0.8%). On the other hand, the hot water and room temperature extracts from *F. vesiculosus* exhibited high contents of total sugars (13.8 ± 2.1%) and of soluble fibers (17.2 ± 0.7%), respectively.

The *F. vesiculosus* aqueous extracts were selected to be incorporated into vegetarian alheira at 0.4% (m/m wet weight), and were subsequently submitted to an evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and oxidation state by Folin-Ciocalteu, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) methods. Also protein, ash, lactic acid, pH, color and sensory analysis were evaluated. Results show that there were no significant differences between the alheiras containing the macroalgae extract and the base formulation of the alheira (control), except

for the color analysis, in which the incorporation of the extract decrease the L \* parameter against the control.

## Índice

INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 MACROALGAS.....	3
1.1.1 Composição e valor nutricional.....	4
Polissacarídeos e fibra dietética.....	4
Proteína e aminoácidos.....	5
Lípidos e ácidos gordos.....	6
Minerais.....	7
Vitaminas.....	8
Compostos fitoquímicos.....	9
1.1.2 Benefícios para a saúde.....	10
1.1.3 Incorporação em alimentos.....	13
1.2 OBJETOS DE ESTUDO.....	21
1.2.1 Macroalgas em foco: <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp. ....	21
1.2.2 Alheira.....	23
2. MÉTODOS.....	25
2.1 REAGENTES.....	25
2.2 MACROALGAS <i>F. VESICULOSUS</i> E <i>GRACILARIA</i> SP. ....	25
2.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E QUÍMICA DE EXTRATOS DAS MACROALGAS <i>F. VESICULOSUS</i> E <i>GRACILARIA</i> SP. ....	26
2.3.1 Produção de extratos.....	26
2.3.2 Quantificação total de polifenóis.....	26
2.3.3 Método de captação de radicais livres (DPPH').....	27
2.3.4 Método do Poder Redutor (FRAP).....	27
2.3.5 Método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	28
2.4 CAPACIDADE DOS EXTRATOS NA INIBIÇÃO DE ENZIMAS.....	29
2.4.1 Atividade da $\alpha$ -amilase.....	29
2.4.2 Atividade da $\alpha$ -glucosidase.....	30
2.4.3 Atividade da lipase pancreática.....	30
2.5 ANÁLISE NUTRICIONAL DOS EXTRATOS.....	30
2.5.1 Teor de humidade.....	30
2.5.2 Teor de cinzas.....	31
2.5.3 Teor de proteína.....	31

2.5.4 Teor de fibra dietética.....	31
2.5.5 Teor de açúcares livres .....	32
2.6 PRODUÇÃO DA ALHEIRA VEGETARIANA COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>F. VESICULOSUS</i> .....	33
2.7 CARACTERIZAÇÃO DA ALHEIRA VEGETARIANA.....	34
2.7.1 Análises físico-químicas.....	34
Determinação da cor.....	34
Índice de acastanhamento.....	35
Teor de humidade, cinzas e proteína .....	35
Determinação da acidez titulável e pH.....	35
2.7.2 Avaliação de teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	35
2.7.3 Estado de oxidação.....	36
2.7.4 Análise sensorial.....	37
2.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS .....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1 Caracterização dos extratos das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.....	39
3.1.1 Rendimentos da liofilização .....	39
3.1.2 Quantificação total de compostos fenólicos .....	40
3.1.3 Avaliação do poder antioxidante pelo método de DPPH' .....	41
3.1.4 Avaliação da capacidade antioxidante pelo método do poder redutor (FRAP).....	43
3.1.5 Avaliação da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	45
3.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS.....	46
3.3 ANÁLISE NUTRICIONAL DOS EXTRATOS.....	47
3.3.1 Proteína.....	48
3.3.2 Cinzas .....	49
3.3.3 Açúcares livres .....	49
3.3.4 Fibra .....	50
3.4 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS NA ALHEIRA VEGETARIANA .....	51
3.4.1 Escolha do extrato a incorporar.....	51
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ALHEIRA VEGETARIANA .....	52
3.5.1 Análise da cor.....	52
3.5.2 Análise química da alheira .....	54
3.5.3 Teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estado de oxidação.....	55
3.5.4 Análise sensorial.....	58
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
5. REFERÊNCIAS .....	61

## Índice de Figuras

Figura 1- Macroalga <i>F. vesiculosus</i> (Imagem da AlgaeBase).....	22
Figura 2- Macroalga do género <i>Gracilaria</i> (Imagem da AlgaeBase).....	22
Figura 3 - Alheira vegetariana (Imagem da Innatura) .....	23
Figura 4 - Extrato de água quente da macroalga <i>F. vesiculosus</i> .....	33
Figura 5 - Produção da alheira vegetariana na empresa Irmãos Monteiro, S.A .....	34
Figura 6 - Rendimentos dos extratos liofilizados obtidos a partir das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.....	39
Figura 7 - Teor de compostos fenólicos totais obtidos a partir dos extratos das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.....	40
Figura 8 - Potencial antioxidante pelo método de DPPH· obtido a partir dos extratos das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.....	42
Figura 9 - Potencial antioxidante pelo método de FRAP obtido a partir dos extratos das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.....	43
Figura 10 - Potencial antioxidante pelo método do β-caroteno/ácido linoleico obtido a partir dos extratos das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp. ....	45
Figura 11 - Teor proteico obtido nos extratos da <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp....	48
Figura 12 - Teor de cinzas obtido nos extratos da <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp...49	
Figura 13 – Teor de açúcares livres, expresso em percentagem, na base seca, obtido nos extratos da <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.... ..	50
Figura 14 - Teor de compostos fenólicos totais (A), atividade antioxidante (ABTS <sup>+</sup> ) (B) e estado de oxidação (TBARS) (C) obtidos a partir da alheira controlo, alheira com extrato de H <sub>2</sub> O fria e H <sub>2</sub> O quente da <i>F. vesiculosus</i> .....	57
Figura 15 - Resultados da análise sensorial obtidos a partir dos extratos da alheira controlo, extrato de H <sub>2</sub> O fria e H <sub>2</sub> O quente da <i>F. vesiculosus</i> .....	58





## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Teor de fibra das macroalgas comparadas com alimentos inteiros (adaptado de (17)).....	4
Tabela 2 – Comparação do teor proteico entre macroalgas e outros alimentos (adaptado de (21)).....	5
Tabela 3 – Comparação do teor de aminoácidos entre as macroalgas, plantas leguminosas, proteína do ovo e os valores recomendados pela FAO/WHO (Adaptado de (18,21,22)).....	6
Tabela 4- Conteúdo mineral das macroalgas comparado com outros alimentos (adaptado de (9) e (34)) .....	8
Tabela 5 – Efeito in vitro dos diferentes extratos das macroalgas nas enzimas associadas à diabetes e obesidade.....	12
Tabela 6 - Efeito da incorporação da farinha de macroalgas nas propriedades dos alimentos.....	17
Tabela 7 – Efeito da incorporação dos extratos de macroalgas nas propriedades dos alimentos.....	20
Tabela 8- Valor nutricional das macroalgas <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp. ....	26
Tabela 9 – Valores de IC <sub>50</sub> obtidos pelo método do DPPH· para os extratos da <i>F. vesiculosus</i> e ácido ascórbico .....	43
Tabela 10 - Valores de EC <sub>50</sub> obtidos pelo método de FRAP para os extratos de <i>F. vesiculosus</i> e para o BHA. ....	44
Tabela 11 – Valores de IC <sub>50</sub> obtidos pelo método do β-caroteno/ácido linoleico para os extratos de <i>F. vesiculosus</i> e BHA. ....	46
Tabela 12 - Atividade inibitória dos extratos <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp. na α-glucosidase e lipase.....	47
Tabela 13 - Teor de fibra insolúvel e solúvel obtido nos extratos da <i>F. vesiculosus</i> e <i>Gracilaria</i> sp.....	51
Tabela 14 – Resultados da análise da cor à alheira controlo (A_C), alheira com extrato de H <sub>2</sub> O à temperatura ambiente (A_ETA) e H <sub>2</sub> O quente (A_EQ) da <i>F. vesiculosus</i> .....	53

Tabela 15 - Valores obtidos na caracterização química da alheira controlo (A\_C),  
alheira com extrato de H<sub>2</sub>O à temperatura ambiente (A\_ETA) e H<sub>2</sub>O quente (A\_EQ)  
da *F. vesiculosus* ..... 54

## **Lista de abreviaturas / Siglas**

PUFA: Ácido gordo polinsaturado

DHA: Ácido docosa-hexaenóico

EPA: Ácido eicosapentaenóico

$\omega$ -3: ómega 3

$\omega$ -6: ómega 6

$\omega$ -9: ómega 9

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

WHO: Organização Mundial de Saúde

UV: Ultravioleta

FRAP: Poder redutor do ferro

RPM: Rotações por minuto

NM: Nanometros

IA: Índice de acastanhamento

IC<sub>50</sub>: Concentração capaz de inibir 50% da amostra

EC<sub>50</sub>: Concentração efetiva com 50% de eficácia

TBARS: Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico

EAA: Equivalentes de ácido ascórbico

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EBHA: Equivalentes de hidroxianisol butilado



## INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje é notória uma sociedade com um estilo de vida caracterizado pela falta de tempo e stress favorecendo o consumo de alimentos com um elevado teor calórico e a uma prática de exercício físico cada vez mais reduzida (1).

Este desequilíbrio na alimentação reflete-se em hábitos alimentares pouco saudáveis, que estão muito relacionados com os principais problemas de saúde civilizacionais como a diabetes, obesidade, diminuição de defesas e carência de nutrientes (1). Assim, com o objetivo de reverter este tipo de problemas, que cada vez mais são uma realidade nos dias de hoje, ao longo dos últimos anos as indústrias alimentares têm feito um esforço no sentido de desenvolver alimentos que sejam apelativos ao consumidor, ricos em termos nutricionais e/ou funcionais. Dentro desta tendência o lançamento de novos produtos com macroalgas ocorre maioritariamente no mercado asiático quando comparado com os restantes países do mundo. Contudo, na União Europeia a procura de produtos contendo macroalgas tem vindo a crescer, levando a um aumento no lançamento de novos produtos nos mercados europeus. No cenário europeu entre 2011 e 2015, os novos produtos em que utilizam as macroalgas sob diferentes formas, desde inteiras ou na forma de flocos, farinha ou extratos, aumentaram 147% o que torna a Europa a região mais inovadora depois da Ásia (2). A preocupação de demonstrar as potencialidades bioativas de alimentos com as macroalgas como ingrediente tem-se refletido num crescente aumento no número de trabalhos científicos nesta área de investigação.

Hoje em dia, os consumidores mostram-se cada vez mais atentos aos produtos alimentares que compram, dando um maior grau de importância aos valores nutricionais e aos benefícios que o consumo de determinado alimento lhes pode conferir. Note-se, por exemplo, o aumento de consumo de produtos de origem botânica, que em parte se deve ao facto de estes estarem identificados como fortes aliados da longevidade e do envelhecimento saudável (3).

Assim, este trabalho tem como objetivo perceber se a utilização de extratos das macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria sp.* podem conferir benefícios ao nível nutricional e funcional em alimentos. Para isso, numa primeira fase foi efetuado um rastreamento de vários extratos, com o intuito de estudar a composição química e atividade

biológica (antioxidante e enzimática), para posterior aplicação numa alheira vegetariana de forma a conferir efeito benéfico ao consumidor.

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 MACROALGAS

As macroalgas são organismos fotossintéticos multicelulares, diferentes das designadas plantas superiores, uma vez que não possuem raízes, folhas ou tecidos vasculares (floema e xilema) (4). Estas são comumente encontradas em habitats marinhos, onde desempenham um papel importante na manutenção e estruturação dos ecossistemas através da produção de material orgânico a partir da luz solar, dióxido de carbono e água (5,6). As macroalgas apresentam pigmentações muito diversificadas, no entanto, todas têm um elemento em comum, a clorofila. As macroalgas verdes são caracterizadas por possuírem na sua composição clorofila a e b, conferindo-lhes assim a cor típica. Adicionalmente, têm também presente xantofilas (luteína e zeaxantina). No que diz respeito às macroalgas castanhas, estas apresentam uma diversidade morfológica significativa e são caracterizadas pelos pigmentos fotossintéticos primários: clorofila a, c1 e c2 e por outros pigmentos como a fucoxantina, que confere a cor castanha, a neofucoxantina e o  $\beta$ -caroteno (7). Por fim, as macroalgas vermelhas são principalmente caracterizadas pelos pigmentos clorofila a e as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina), sendo estas últimas as proteínas responsáveis pela sua coloração, embora a sua cor varie de acordo com a proporção de ficoeritrina e ficocianina. Para além destes pigmentos, estas macroalgas possuem os carotenoides  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina (4).

A classificação das macroalgas é assim efetuada com base na sua composição pigmentar, apesar do sistema de classificação ter sido alterado ao longo do tempo, considera-se que as macroalgas verdes, vermelhas e castanhas pertencem aos Filo Chlorophyta, Rhodophyta e Heterokontophyta, respetivamente (8).

Em todo o mundo são usadas cerca de 221 espécies de macroalgas: 125 (vermelhas), 64 (castanhas) e 32 (verdes). Destas, cerca de 145 têm como finalidade a utilização direta nos alimentos, enquanto as restantes são utilizadas em indústrias de ficocoloides, medicina tradicional, agricultura e em rações de animais (9).

### 1.1.1 Composição e valor nutricional

As macroalgas têm propriedades muito interessantes do ponto de vista nutricional, sendo atualmente consideradas como “superalimentos”, principalmente por serem praticamente isentas de gordura, possuírem baixo conteúdo calórico e serem muito ricas em minerais essenciais, vitaminas, proteínas e outros fitoquímicos (10,11).

#### Polissacarídeos e fibra dietética

As macroalgas são na generalidade ricas em polissacarídeos, embora a sua abundância seja muito variável nas diferentes espécies, apresentando valores entre 4 e 76% de peso seco (12). No que diz respeito aos polissacarídeos da parede celular, é possível encontrar em maior quantidade o alginato nas macroalgas castanhas; agar e carragenana predominam nas macroalgas vermelhas e as ulvanas nas macroalgas verdes. Em menor quantidade, encontram-se polissacarídeos contendo fucose sulfatada (macroalgas castanhas), xilanas (macroalgas vermelhas e verdes) e a celulose (encontrada de um modo geral em todos os géneros de plantas superiores). Ao nível dos polissacarídeos de reserva, as macroalgas verdes possuem o amido, enquanto as macroalgas castanhas possuem a laminarina e as macroalgas vermelhas possuem amido florídeo (7,13).

Muitos dos polissacarídeos não são digeridos pelas secreções do trato gastrointestinal humano, sendo por isso considerados fibra dietética. No geral, esta é classificada em dois tipos de acordo com a sua solubilidade em água, designadamente em fibra insolúvel (como a celulose e xilana) e fibra solúvel (como o agar-agar, ácido algínico e laminarina) (13). A fibra total presente nas macroalgas varia entre 33 e 62% de matéria seca, uma quantidade superior quando comparado com as plantas terrestres (Tabela 1) (14). Contudo, os valores de fibra dietética total, insolúvel e solúvel podem variar dependendo da origem geográfica, variações sazonais e até mesmo o próprio processamento (secagem, moagem) depois da colheita (15,16).

Tabela 1 - Teor de fibra das macroalgas comparadas com outros alimentos (adaptado de (17))

(% de peso seco)	Fibra insolúvel	Fibra solúvel	Fibra total
<i>Porphyra sp.</i>	16,8	17,9	34,7
<i>Undaria sp.</i>	5,3	30	35,3
<i>Ulva lactuca</i>	16,8	21,3	38,1



<b>Cebolas</b>	13,32	3,59	16,89
<b>Batatas</b>	4,85	2,14	6,99
<b>Pêras</b>	39,53	27,30	66,83

### Proteína e aminoácidos

As macroalgas possuem uma elevada quantidade de proteína, principalmente as verdes e as vermelhas, geralmente numa gama de 9-26% e 10-47% de peso seco, respetivamente (18). Por sua vez, as macroalgas castanhas apresentam um conteúdo relativamente mais baixo, 6-13% de peso seco (19). Estes valores podem ser considerados elevados, quando comparados com alguns alimentos de elevado conteúdo proteico, como é o caso das cenouras, ovos e feijão (Tabela 2) (18,20). Em termos de variação do conteúdo proteico, é notória a influência de diversos fatores como a espécie, condições ambientais e ciclo de vida (18).

Tabela 2 – Comparação do teor proteico entre macroalgas e outros alimentos (adaptado de (21))

<b>Amostra</b>	<b>Proteína (g/100g de peso seco)</b>	
<b>Macroalga</b>	Verde	9-26%
	Vermelha	10-47%
	Castanha	6-13%
<b>Outros alimentos</b>	Cenoura	11,0%
	Ovo	49,80%
	Feijão	40,3%

Na grande maioria, as macroalgas contêm todos os aminoácidos essenciais cuja concentração é próxima dos valores recomendados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/ Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO) (22). As macroalgas castanhas possuem elevadas quantidades de ácido glutâmico e ácido aspártico, enquanto as macroalgas vermelhas possuem níveis de isoleucina e treonina muito semelhantes aos encontrados na proteína de leguminosas (Tabela 3) (18).

Tabela 3 – Comparação do teor de aminoácidos entre as macroalgas, plantas leguminosas, proteína do ovo e os valores recomendados pela FAO/WHO (Adaptado de (18,21,22))

<b>Aminoácidos (aa) g aa / g proteína</b>	<b><i>Porphyra</i> sp.</b>	<b><i>Ulva pinnatifida</i></b>	<b><i>Laminarina</i> sp.</b>	<b>Plantas leguminosas</b>	<b>Ovalbumina</b>	<b>FAO/WHO</b>
<b>(His)</b>	2,4-2,6	0,5-2,5	2,2	3,8-4,0	4,1	-
<b>(Ile)</b>	3,1-3,3	2,8-4,1	2,7	3,6	4,8	2,8
<b>(Leu)</b>	5,9-7,1	7,4-8,4	4,9	7,3	6,2	6,6
<b>(Lis)</b>	4,9-5,2	3,6-5,6	3,9	6,4-6,5	7,7	5,8
<b>(Met)</b>	1,7	1,7-2,0	0,9	1,2-1,4	3,1	2,5
<b>(Phe)</b>	3,3-3,5	3,6-4,7	3,2	2,4	4,1	-
<b>(Thr)</b>	5,2	4,4-5,4	3,5	4,0	3,0	3,4
<b>(Trp)</b>	0,7	0,7-1,1	0,5	1,6-1,9	1,0	1,1
<b>(Val)</b>	4,5-5,2	5,2-6,8	3,8	4,5	5,4	3,5
<b>(Ala)</b>	2,2-6,2	4,4-4,7	5,7	-	6,7	-
<b>(Arg)</b>	5,9	3,0-5,2	3,3	13,0-14,0	11,7	-
<b>(Asp)</b>	8,5	5,9-8,7	12,5	4,7-5,4	6,2	-
<b>(Glu)</b>	9,3	6,5-14,5	23,8	6,4-6,7	9,9	-
<b>(Cys)</b>	1,2	0,9	1,2	1,1-1,3	-	-
<b>(Gly)</b>	4,1-5,1	3,6-5,1	4,0	-	3,4	-
<b>(Pro)</b>	3,5	3,0-3,6	3,1	-	2,8	-
<b>(Ser)</b>	4,0-4,9	2,5-4,0	3,3	-	6,8	-
<b>(Tyr)</b>	3,4	1,6-2,9	1,7	2,3-2,6	1,8	6,3

### Lípidos e ácidos gordos

O conteúdo lipídico das macroalgas é muito reduzido, cerca de 0,7-1,8% de peso seco, no entanto, o perfil das macroalgas é no geral muito interessante em termos nutricionais, já que na sua grande maioria é composto por ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (23). Naturalmente, tal como para os outros nutrientes, o conteúdo e composição dos ácidos gordos é uma variável dependente do tipo de espécie, localização, condições sazonais e ambientais (24).

Os PUFA com a dupla ligação no carbono 3 ou 6 são os considerados ácidos gordos essenciais, uma vez que o corpo humano não tem a capacidade de os sintetizar, tendo por isso que ser obtidos a partir da dieta. Assim, estes ácidos são indicados como benéficos para a saúde, dado o seu potencial para reduzir o risco de várias doenças, como as cardiovasculares, osteoporose e diabetes. O ácido docosa-hexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) são obtidos a partir da série ómega 3 ( $\omega$ -3) dos PUFA. O DHA é

um componente estrutural importante das membranas celulares, estando presente em elevados níveis no tecido cerebral e na retina. Por sua vez, o ácido araquidónico é obtido a partir da série ómega 6 ( $\omega$ -6) dos PUFA, desempenhando o papel de precursor de eicosanóides, sintetizados a partir do ácido linoleico (25).

A razão de ácidos gordos essenciais  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 deve estar próxima de 4:5-5:1 e não deve exceder os 10:1, dado que uma baixa razão está associada a baixa ocorrência de doenças cardiovasculares (26,27). No entanto, nos dias de hoje as dietas ocidentais contêm em média cerca de 15:1, ou seja, são notavelmente deficientes em  $\omega$ -3 e possuem quantidades excessivas de  $\omega$ -6 (27). Nas macroalgas, a proporção de  $\omega$ -6 é em geral baixa, resultando frequentemente numa razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 de aproximadamente 1 nas macroalgas vermelhas e castanhas (14).

De um modo geral, as macroalgas vermelhas e castanhas possuem na sua composição ácidos gordos com 20 átomos de carbono, como é o caso do ácido eicosapentaenóico (20:5  $\omega$ -3) e do ácido araquidónico (20:4  $\omega$ -6). As macroalgas castanhas e verdes apresentam quantidades relativamente elevadas de ácido palmítico (16:0) e oleico (18:1  $\omega$ -9) (28). Em termos de fração insaponificável, as macroalgas têm presente esteróis, terpenoides, tocoferóis e alguns carotenoides, como a luteína, violaxantina e  $\beta$ -caroteno (em macroalgas verdes e vermelhas) e fucoxantina nas macroalgas castanhas (12).

### Minerais

No geral, as macroalgas possuem um elevado conteúdo de minerais (8-40% peso seco) (21) que se relaciona com a sua capacidade de reter substâncias inorgânicas devido às características dos polissacarídeos da superfície celular (29). No entanto, este conteúdo pode variar dependendo do filo a que pertencem, das condições ambientais, geográficas e sazonais (30). Note-se que os minerais têm um papel importante no bom funcionamento do metabolismo humano, sendo por exemplo conhecidas as necessidades de magnésio na absorção de cálcio, o cálcio na atividade de muitas enzimas como a NO sintetase, o iodo a nível da tiroide, o crómio na regulação do açúcar no sangue e o ferro, muito importante no transporte de oxigénio, síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) e transporte de eletrões (31-33). De entre minerais e oligoelementos, as macroalgas têm a capacidade de fornecer cerca de 56, sendo estes essenciais na manutenção das funções metabólicas do corpo (10).

Ao comparar o teor de minerais das macroalgas com as plantas terrestres, é possível verificar que as macroalgas possuem uma quantidade superior (Tabela 4) (9,34). Entre outros, as macroalgas possuem elevadas quantidades de magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), zinco (Zn), iodo (I) e ferro (Fe). Apesar de terem elevado teor de Na e K, a razão Na/K das macroalgas por norma é baixa, sendo este um detalhe importante de forma a compensar as dietas ocidentais que são ricas em NaCl (35).

Tabela 4- Conteúdo mineral das macroalgas comparado com outros alimentos (adaptado de (9) e (34))

	Na	K	P	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu	I
<b>(mg/100g peso seco)</b>										
<i>Fucus vesiculosus</i>	2450- 5469	2500- 4322	315	725- 938	670- 994	4- 11	3,71	5,50	< 0,5	14,5
<i>Gracilaria spp.</i>	5465	3417	-	402	565	3,65	4,35	-	-	-
<i>Ulva rigida</i>	1595	1561	210	524	2094	283	0,6	1,6	0,5	-
<b>(mg/100g de peso)</b>										
<b>Espinafre</b>	140	500	-	170	54	2,1	0,7	-	0	2
<b>Bananas</b>	1	400	-	6	34	0,3	0,2	-	0,1	8
<b>Amendoins</b>	2	670	-	60	210	2,5	3,5	-	1	20

### Vitaminas

As macroalgas são uma excelente fonte rica em micronutrientes, como é o caso das vitaminas. Têm presente vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, sendo possível encontrar as vitaminas A, D, E e B5, B9, B12, C, respetivamente (36,37). As macroalgas castanhas, possuem em geral níveis mais elevados de vitamina E em comparação com as verdes e vermelhas, contendo as variedades  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol, enquanto as duas últimas apresentam apenas  $\alpha$ -tocoferol (4). A vitamina E desempenha uma função importante na nutrição humana, pela sua capacidade antioxidante, revelando-se capaz de inibir por exemplo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (38).

Em termos de vitamina C, no geral as macroalgas castanhas e verdes possuem níveis mais elevados do que as vermelhas. Esta é uma vitamina importante na absorção intestinal de ferro e na regeneração da vitamina E. Ao contrário de muitas plantas, algumas macroalgas como a *Porphyra* e *Ulva* têm presente elevada quantidade de vitamina B12, tornando-se numa macroalga de interesse relevante para os vegetarianos, dado que esta vitamina geralmente se encontra presente em produtos de origem animal (4,39).

### Compostos fitoquímicos

A maioria das macroalgas marinhas vive em habitats com condições extremas conduzindo assim à formação de radicais livres. Contudo, apresentam mecanismos de defesa química inerentes disponíveis, produzindo metabolitos secundários capazes de atuar contra o stress oxidativo (40). De entre uma mistura complexa obtida a partir do extrato de macroalgas castanhas, é possível encontrar os compostos fitoquímicos de maior interesse, como é o caso de pigmentos e compostos fenólicos (41).

A fucoxantina é uma xantofila (carotenoide), tendo presente uma estrutura única, que inclui um carbono aleno, um grupo epóxido e um grupo carbonilo conjugado na cadeia poliénica. Esta, é um dos carotenoides presente em maior quantidade nos cloroplastos das macroalgas castanhas (42). Os níveis deste pigmento nas macroalgas variam consoante o ciclo de vida e a estação do ano, mas por norma, apresentam valores mais elevados no inverno do que no verão (43). Este composto, tem sido associado a várias atividades benéficas para a saúde, nomeadamente devido às propriedades antioxidantes (44), antidiabéticas e anti-obesidade (45). Por outro lado, nas macroalgas vermelhas, o principal pigmento encontrado é a *R*-ficoeritrina, uma ficobiliproteína. Esta, em conjunto com outras ficobiliproteínas têm sido usadas ao longo de décadas como corantes naturais em produtos alimentares (46). Estas macroalgas apresentam níveis de ficoeritrina, tal como de fucoxantina, mais elevados no inverno do que no verão (47). As ficobiliproteínas têm sido associadas a propriedades biológicas, nomeadamente a atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (48).

Em termos químicos, os compostos fenólicos são caracterizados por um anel aromático tendo um ou mais grupos hidroxilos substituintes, variando entre compostos monoméricos, oligoméricos ou poliméricos. Os florotaninos são metabolitos secundários produzidos principalmente pelas macroalgas castanhas, não sendo encontrados nas plantas

terrestres. Estes são constituídos por polímeros de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno), encontrados em vesículas, mais concretamente nas fisoides das células (49). Algumas espécies de macroalgas castanhas, como a *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Ecklonia kurome* são boas fontes de florotaninos (50). Vários estudos têm também isolado vários destes compostos, em particular, alguns oligómeros de florotaninos, entre os quais o fucofloreto A, tetrafucol A e trifucodifloreto A, foram isolados a partir da *Fucus vesiculosus* (51). Diversos autores demonstraram que estes compostos possuem uma elevada capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (52–54), entre outras.

### 1.1.2 Benefícios para a saúde

Nas últimas décadas a sociedade tem sido confrontada com um aumento drástico na incidência da síndrome metabólica, como é caso da diabetes, sendo estimado que mais de 640 milhões de pessoas sofrerão desta patologia até 2040 (55). Apesar do grande contributo dos fatores genéticos, é também altamente influenciada por uma dieta não saudável, inatividade física, consumo de tabaco e obesidade (56).

Em países como o Japão e a Coreia, as macroalgas são parte integrante da dieta tradicional e existe uma menor prevalência destas síndromes, sugerindo que as macroalgas podem conter compostos bioativos que sejam capazes de contribuir de forma positiva para a redução de alguns sinais característicos, nomeadamente da diabetes e obesidade (57).

Dentro deste contexto, as enzimas  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase são um alvo terapêutico importante dada a sua participação na etapa do processo digestivo de carboidratos dietéticos complexos. A  $\alpha$ -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de vários oligossacarídeos, enquanto a  $\alpha$ -glucosidase metaboliza dissacarídeos mais simples para a absorção intestinal. Assim, a inibição destas enzimas, para além de poder retardar a digestão de oligossacarídeos e dissacarídeos, pode também retardar a absorção de glucose pelo intestino delgado e reduzir os níveis de glucose no plasma (50). Na Tabela 5 encontram-se alguns estudos resumidos que demonstram a capacidade dos componentes das macroalgas em inibir estas enzimas.

Nwosu *et al.* (58) tiveram como objetivo estudar os extratos ricos em fenólicos de quatro macroalgas marinhas, nomeadamente da *Palmaria palmata*, *Ascophyllum nodosum*, *Alaria esculenta* e *Ulva lactuca*, e a respetiva capacidade de inibir as enzimas digestivas, de forma a conseguir obter potenciais efeitos anti-diabéticos. Das quatro macroalgas selecionadas, os autores excluíram a *Ulva lactuca*, devido à baixa recuperação de fenólicos.

A *Ascophyllum nodosum* foi a que revelou maior conteúdo fenólico (4547,8 µg/g peso seco), com um valor de IC<sub>50</sub> para a enzima α-amilase (concentração de extrato necessária para inibir a atividade enzimática em 50%) cerca de 0,1 µg/mL EAG (equivalentes de ácido gálico). Note-se que este valor é inferior ao da acarbose (aproximadamente 0,8 µg/mL) isto é, um inibidor da α-glucosidase e α-amilase. Também o extrato de *A. nodosum* se mostrou eficaz na inibição da enzima α-glucosidase, apresentando um valor de IC<sub>50</sub> cerca de 20 µg/mL EAG. Assim, os autores concluíram que os compostos fenólicos presentes na *A. nodosum* parecem ter potencial efeito antidiabético, inibindo estas duas enzimas chave do metabolismo dos açúcares.

Um estudo semelhante realizado por Apostolidis *et al.* (59) pretendeu identificar a macroalga com maior conteúdo fenólico, determinar as condições ótimas de extração em termos da razão macroalga/água e temperatura para posterior utilização como inibidora das enzimas α-glucosidase e α-amilase. De entre as macroalgas em estudo, *Ascophyllum nodosum*, *Ceramium virgatum*, *Ulva lactuca* e *Saccharina latíssima*, a *A. nodosum* foi a escolhida, pelo facto de apresentar o maior conteúdo em compostos fenólicos. Ao variar a temperatura entre 20°C e 80°C, concluiu-se que a extração a 80°C foi aquela que resultou num maior conteúdo em compostos fenólicos (4,2 mg/g peso húmido). Os extratos apresentaram níveis semelhantes de atividade antioxidante contra o radical DPPH<sup>•</sup>. O extrato a 80°C foi o que revelou uma maior atividade inibitória da α-glucosidase e α-amilase com um valor de IC<sub>50</sub> de 0,24 e 1,34 µg peso fresco, respetivamente, comparando com o inibidor de referência (acarbose), sendo 0,37 e 0,68 µg respetivamente. Estes resultados, mostram que a *A. nodosum* tem uma forte atividade inibitória na α-glucosidase e mais suave na α-amilase, estando correlacionado com o conteúdo em compostos fenólicos.

Um outro estudo realizado por Hwang *et al.* (60) teve como objetivo estudar a atividade inibitória da α-amilase e α-glucosidase pela macroalga *Sargassum hemiphyllum*. Para tal, prepararam extrato aquoso (EAQ), etanol 95% (EE) e acetona 70% (EA). Dos 3 extratos preparados, o EA foi o que revelou um maior conteúdo polifenólico (36,66±2,01 mg/g), seguindo-se o EE (22,35±1,41 mg/g) e o EAQ com (17,35±0,93 mg/g). A fucoxantina foi apenas detetada no extrato de EE (7,89±0,03 mg/g) e EA (15,12±0,09 mg/g). Aplicando estes extratos como inibidores da α-amilase, sucrase e maltase, os autores verificaram que os valores de IC<sub>50</sub> do extrato EA para a α-amilase, sucrase e maltase foram de 0,35±0,05; 1,89±0,03 e 0,09±0,01 mg/mL, respetivamente. Já o extrato de EE inibiu apenas a sucrase e

a maltase com um IC<sub>50</sub> de 3,47±0,10 e 2,88±0,09 mg/ml e o extrato de EAQ não teve qualquer efeito inibitório. Os resultados sugerem assim, que a atividade inibitória das enzimas, está correlacionada com a concentração de polifenóis e fucoxantina, presentes nos extratos da *S. hemiphyllum*.

Para além das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase, a lipase pancreática é também um alvo terapêutico no tratamento da obesidade, uma vez que, a sua inibição diminui os ácidos gordos livres e os monoacilgliceróis no lúmen intestinal, contribuindo para uma diminuição da absorção de triacilgliceróis (61). Com o intuito de se obter inibidores a partir de fontes naturais, existem alguns estudos que apresentam as macroalgas como uma fonte promissora de agentes anti-obesidade. Um estudo realizado por Eom *et al.* (62) pretendeu estudar o extrato metanólico da *Eisenia bicyclis* como inibidor da lipase pancreática. A partir do extrato metanólico, fizeram o isolamento e identificação de 6 florotaninos: “*eckol*”, “*fucofuroeckol*”, “*7-phloroeckol*”, “*dioxindehydroeckol*”, “*phlorofucofuroeckol A*” e “*dieckol*”. De entre os compostos isolados, o “*fucofuroeckol*” e “*7-phloroeckol*”, foram os que apresentaram um potente efeito inibitório na lipase pancreática com valores de IC<sub>50</sub> numa gama de 37,2±2,3 e 12,7±1,0 mM, respetivamente.

Um outro estudo realizado por Wilcox *et al.* (63), verificaram que o alginato obtido a partir da macroalga *Laminaria hyperborea*, com um elevado conteúdo de ácido glucurónico, revelou uma maior capacidade de inibir a lipase pancreática do que o alginato obtido a partir da macroalga *Lessonia nigrescens*, com elevado teor de ácido manurónico. O estudo revelou assim que a atividade inibidora pode variar dependendo da fonte e forma química do composto.

Tabela 5 – Efeito in vitro dos diferentes extratos das macroalgas nas enzimas associadas à diabetes e obesidade

<b>Doença</b>	<b>Macroalga</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
<b>Diabetes</b>	<i>P. palmata</i> , <i>A. nodosum</i> , <i>A. esculenta</i> e <i>U. lactuca</i>	Extrato da <i>A. Nodosum</i> : Maior conteúdo em compostos fenólicos (4547,8 µg/g peso seco); valor de IC <sub>50</sub> de 0,1 e 20 µg/mL(EAG) nas enzimas $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glucosidase, respetivamente.	(58)
	<i>A. nodosum</i> , <i>C. virgatum</i> , <i>U.</i>	Extrato de <i>A. Nodosum</i> : extrato a 80°C originou um conteúdo em compostos fenólicos de 4,2 mg/g peso húmido; revelou	(59)



<i>lactuca</i> e <i>S. latissima</i>	maior atividade inibitória da $\alpha$ -glucosidase e $\alpha$ -amilase, com valor de IC <sub>50</sub> de 0,24 e 1,34 $\mu$ g de fenólicos, respetivamente.	
<i>S. hemiphyllum</i>	Extrato de acetona da <i>S. hemiphyllum</i> : maior conteúdo em compostos polifenólicos (36,66 $\pm$ 2,01 mg/g); valores de IC <sub>50</sub> da $\alpha$ -amilase, sucrase e maltase: 0,35 $\pm$ 0,05; 1,89 $\pm$ 0,03 e 0,09 $\pm$ 0,01 mg/mL, respetivamente.	(60)
<b>Obesidade</b>	“ <i>Fucofuroeckol</i> ” e “ <i>7-phloroeckol</i> ”	(62)
<i>E. bicyclis</i>	apresentaram maior efeito inibitório da lipase, com valores de IC <sub>50</sub> numa gama de 37,2 $\pm$ 2,3 e 12,7 $\pm$ 1,0 mM, respetivamente.	
<i>L.hyperborea</i> e <i>L. nigrescens</i>	Maior capacidade de inibir a lipase com o alginato contendo elevado ácido glucurónico obtido da <i>Laminaria hyperborea</i> do que o alginato com elevado ácido manurónico obtido a partir da <i>Lessonia nigrescens</i> .	(63)

### 1.1.3 Incorporação em alimentos

Hoje em dia, as indústrias alimentares procuram soluções que satisfaçam os consumidores na busca por um estilo de vida mais saudável, nomeadamente através da produção de alimentos que não visam somente saciar a fome ou fornecer os nutrientes necessários, mas também aliado à capacidade de prevenir doenças e aumentar o bem-estar físico e mental dos consumidores, não devendo ser encarados como uma solução, mas sim como um auxílio (64).

A Ação Concertada da Comissão no âmbito do 11º projeto científico europeu sobre alimentos funcionais (FUFOSE), define alimento funcional como: “Um produto alimentar só pode ser considerado funcional se, juntamente com o impacto nutricional básico, tem efeitos benéficos sobre uma ou mais funções do organismo humano, melhorando as condições gerais e físicas ou diminuindo o risco das doenças” (65).

Várias investigações têm sido realizadas com o intuito de verificar de que forma as macroalgas podem ser incorporadas em alimentos, nomeadamente em salsichas,

hambúrgueres, croquetes de peixe, *noodles*, massas e pão. Na Tabela 6, apresenta-se o resumo de alguns estudos, em que utilizam macroalgas na forma de farinha e os principais efeitos em termos físico-químicos, sensoriais e funcionais no alimento em que foram incorporadas. No que diz respeito às salsichas tipo “*frankfurters*”, um estudo realizado por Jiménez-Colmenero *et al.* (66) pretendeu verificar o efeito da incorporação de 3,3% de farinha da macroalga *Himanthalia elongata* ao nível das características físico-químicas (estabilidade da emulsão, perda de cozimento, cor, textura e microestruturas) e sensoriais de salsichas tipo “*frankfurters*” com baixo e reduzido teor de gordura, preparadas com o gel “*konjac*” como substituto da gordura de porco e ainda reduzindo o teor de sal. A incorporação da macroalga/gel “*konjac*” juntamente com uma diminuição do teor de sal adicionado, levou a um aumento na perda de cozimento e redução da estabilidade da emulsão no sistema gel/emulsão. Ao nível da cor e comparando com as outras amostras, os autores verificaram que a incorporação da macroalga/gel “*konjac*” conduziu a uma diminuição da luminosidade ( $L^*$ ) e vermelhidão ( $a^*$ ), e um aumento do amarelamento ( $b^*$ ). No parâmetro de textura, os efeitos da adição da macroalga nas salsichas com baixo teor de sal variaram dependendo da proporção do gel “*konjac*” usada na formulação, verificado pela diferença na microestrutura. Os autores, concluíram assim que, existem algumas interferências nas propriedades da matriz da carne por incorporação da macroalga/gel.

Num estudo semelhante realizado por Choi *et al.* (67), pretendeu-se verificar o efeito das macroalgas nas propriedades físico-químicas e sensoriais em salsichas tipo “*frankfurters*” com teor de sal reduzido. Para tal, utilizam 1% de farinha das macroalgas *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* e da planta *Salicornia herbacea* L. de forma independente em diferentes ensaios, com o objetivo de compreender quais os efeitos na composição proximal, salinidade, perda por cozimento, estabilidade de emulsão, pH, cor, textura, viscosidade aparente e características sensoriais na massa de carne e nas salsichas com baixo teor em sal. Ao incorporarem a farinha das macroalgas *L. japonica* e *U. pinnatifida* nas salsichas com baixo teor em sal, foi possível melhorar a perda por cozimento e a estabilidade da emulsão, assim como manter as propriedades sensoriais que se revelaram similares ao controlo (com o teor de sal regular). A combinação da macroalga e baixo teor de sal nas salsichas foi mais efetiva com as macroalgas *L. japonica* e *U. pinnatifida*.

Para além das salsichas, tem sido estudada a possibilidade de incorporação em hambúrgueres de carne. Assim, Cox *et al.* (68) estudaram o efeito da adição entre 10-40%

da macroalga *Himathalia elongata* como fonte de fibra dietética, antioxidante e nas propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de hambúrgueres de carne cozinhados, durante o armazenamento refrigerado. Os hambúrgueres que tinham a macroalga incorporada apresentaram reduzidas perdas no cozimento e mostraram ser cerca de 50% mais tenras, quando comparadas com o controlo (sem a macroalga). Em termos microbiológicos e de oxidação lipídica, os valores revelaram-se mais baixos nos hambúrgueres que tinham a macroalga incorporada, em relação ao controlo. Com a incorporação da macroalga, foi também possível aumentar o teor de fibra dietética, compostos fenólicos e a atividade captadora do DPPH\* quando comparado com os hambúrgueres controlo. Assim, a adição da macroalga na formulação dos hambúrgueres de carne levou a um aumento da qualidade nutricional, bem como da qualidade sensorial.

No que diz respeito a produtos com peixe, Senthil *et al.* (69) pretenderam estudar o efeito da utilização da farinha da macroalga *Eucheuma* na qualidade dos croquetes de peixe. Para tal, utilizaram a farinha da macroalga como ingrediente e adicionaram em diferentes concentrações: 5, 7,5, 10, 12,5 e 15%. A avaliação sensorial permitiu perceber que a incorporação da farinha da macroalga influenciou significativamente a textura do croquete, e que, era possível incorporar até 10% da macroalga sem que a aparência, textura e aceitabilidade fossem afetadas.

A incorporação em noodles tem sido investigada por Chang *et al.* (70), em que tiveram como objetivo perceber de que forma a introdução da farinha da macroalga verde *Monostroma nitidum* na formulação de *noodles* chineses, influenciava a textura e as propriedades de qualidade deste produto. Para tal, incorporaram nos *noodles* a macroalga em proporções de 4, 6 e 8%. Verificaram que a adição da farinha da macroalga, aumentou o conteúdo de fibra, levando consequentemente a um aumento da absorção de água durante o cozimento pelas fibras e polissacarídeos presentes na macroalga. Com a elevada absorção de água, os *noodles* ficaram com uma textura mais macia e esponjosa.

Um estudo semelhante realizado por Chang *et al.* (71), pretendeu perceber as mudanças ocorridas na textura dos *noodles* frescos de ovos, contendo na formulação farinha de macroalga e massa de choco. A macroalga *Monostroma nitidum* foi incorporada em diferentes proporções (0, 3 e 6%) nos *noodles* e os ovos líquidos substituídos por massa de choco em (0, 1/3, 2/3 ou substituição total). Os rendimentos mais elevados no cozimento foram obtidos com a incorporação de 6% de macroalga, devido à absorção de água pelas

fibras e polissacarídeos presentes na macroalga. Tal como, no estudo referido anteriormente, a elevada absorção de água pela macroalga fez com que os *noodles* ficassem com uma textura mais macia e esponjosa. Em termos dos parâmetros de textura, estes foram influenciados não só pela substituição da massa de choco e adição da macroalga, mas também pelas propriedades de cozimento, em que os rendimentos foram maiores com a macroalga incorporada.

A possibilidade de incorporar em massas foi avaliada por Prabhasankar *et al.* (72), em que pretenderam utilizar a farinha da macroalga *Undaria pinnatifida* como ingrediente na massa e avaliar de que forma esta incorporação influenciava a parte química, funcional e estrutural. Os autores prepararam a massa com diferentes níveis da farinha da macroalga, 10-30%, de forma a avaliar as propriedades antioxidantes, conteúdo fenólico total, composição de ácidos gordos, conteúdo de fucoxantina e fucosterol, bem como a sua aceitação. Os resultados deste estudo, permitiram concluir que a massa até 10% de macroalga era sensorialmente aceite. A proporção de ácidos gordos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 no controlo foi de 1:15,2 enquanto que, na massa com a macroalga incorporada foi de 1:3,4. O teor em compostos fenólicos totais variou entre 0,10 e 0,94 mg EAG/g, enquanto a atividade antioxidante total variou entre 0,16 e 2,14 mg de ácido ascórbico (EAA)/g entre diferentes amostras. Ainda, a atividade captadora dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e superóxido, nas amostras contendo a farinha da macroalga, foi de 7,71% e 4,56%, respetivamente, na massa sensorialmente aceite. Os processos de calor que envolvem a preparação da massa, não destruíram a fucoxantina. Assim, a incorporação de macroalgas na massa, para além de melhorar o perfil de ácidos gordos, aumentou o valor nutricional devido à presença de componentes biofuncionais como a fucoxantina e fucosterol. Em termos de microestruturas, foi notório que a massa contendo até 20% de macroalga permitia um aumento de interação entre os grânulos de amido e a matriz proteica e conseqüentemente aumentar a qualidade da massa, no entanto, não era sensorialmente aceite.

Um estudo semelhante realizado por Prabhasankar *et al.* (73) teve como objetivo avaliar a influência da farinha da macroalga *Sargassum marginatum* como ingrediente na qualidade, biofuncionalidade e microestrutura da massa. Diferentes níveis de macroalga (1, 2,5 e 5%) foram incorporados na massa, enquanto a massa sem macroalga foi utilizada como controlo. A atividade captadora de radicais livres (DPPH<sup>•</sup>), foi mais elevada na massa cozida com a macroalga incorporada do que na massa crua. A perda por cozimento, foi menor nas

amostras com a macroalga incorporada até 2,5%. Estes autores concluíram assim, que a incorporação da macroalga até 2,5% permitiu obter uma massa com melhor qualidade e biofuncionalidade.

A incorporação em produtos panificados, foi estudada por Mamat *et al.* (74) em que pretenderam perceber qual o efeito da adição da farinha de macroalga nas propriedades de textura na massa e no pão. Assim, os autores adicionaram a farinha da macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* numa proporção entre 2-8% na farinha de trigo utilizada para fabricar o pão. Os resultados do estudo indicaram que a adição da farinha de macroalga aumentou a absorção de água da massa e revelou elevados valores de firmeza. Os autores sugeriram que a farinha da macroalga poderia ser utilizada para substituir a farinha de trigo (até 8%), mantendo as características de qualidade final do produto.

Tabela 6 - Efeito da incorporação da farinha de macroalgas nas propriedades dos alimentos

Tipo de produto	Tipo de macroalga	Quantidade adicionada	Tipo de efeito	Referência
	<i>H. elongata</i>	3,3%	Incorporação da macroalga/gel <i>konjac</i> : ↑ perda por cozimento; ↓ estabilidade da emulsão; interferência nas propriedades da matriz da carne.	(66)
Salsichas	<i>L. japonica</i> , <i>U. pinnatifida</i> , <i>H. fusiforme</i>	1%	Adição da <i>L. japonica</i> ou <i>U. pinnatifida</i> : melhorou a estabilidade da emulsão e perda por cozimento; a combinação macroalga/baixo teor de sal, mais efetivo; propriedades sensoriais mais similares ao controlo.	(67)
Hambúrgueres	<i>H. elongata</i>	10-40%	↓ perda no cozimento; a carne ficou mais tenra; ↑ teor de fibra dietética, compostos fenólicos e atividade captadora do DPPH*.	(68)

Croquetes de peixe	<i>Eucheuma</i>	5, 7,5, 10, 12,5 e 15%	Influenciou a textura do croquete; possibilidade de incorporar até 10% sem afetar textura e aceitabilidade.	(69)
	<i>M. nitidum</i>	4, 6 e 8%	Textura mais macia e esponjosa; ↑ conteúdo de fibra.	(70)
Noodles	<i>M. nitidum</i>	3 e 6%	↑ absorção de água pela macroalga leva à formação de noodles com uma textura mais macia e esponjosa.	(71)
	<i>U. pinnatifida</i>	10-30%	Processos de calor na preparação da massa não destruíram a fucoxantina; ↑ ácidos gordos e valor nutricional; massa com 10% de macroalga, teve uma maior aceitação sensorial.	(72)
Massas	<i>S. marginatum</i>	1, 2,5 e 5%	↑ Atividade captadora de DPPH <sup>*</sup> ; Incorporação da macroalga até 2,5% melhorou a qualidade da massa.	(73)
	<i>K. alvarezii</i>	2-8%	↑ Absorção de água; ↑ Firmeza	(74)

Para além da incorporação da farinha de macroalga, existem vários estudos na literatura que descrevem a incorporação de extratos e os seus efeitos, nomeadamente em presunto, hambúrgueres, salmão e leite, os quais se destacam em resumo na Tabela 7.

Em relação ao presunto, um estudo realizado por Barbieri *et al.* (75) teve como objetivo reduzir o NaCl em presunto cozinhado através da modificação do cozimento e adição do extrato aquoso da macroalga *Palmaria palmata*. Ao modificarem estes dois parâmetros, os autores conseguiram obter um presunto cozido contendo uma percentagem de sal mais reduzida (1,2 e 1%) ao invés de 1,8%, reduzindo assim a ingestão de sódio em

25% e 35%, respetivamente. O extrato da macroalga não se revelou um problema a nível sensorial, mesmo após um período de refrigeração de 6 meses.

No respeitante aos hambúrgueres, um estudo realizado por Moroney *et al.* (76) pretendeu perceber qual o efeito da adição do extrato da macroalga castanha *Laminaria digitata* contendo laminarina e fucoídana, na qualidade e tempo de prateleira de hambúrgueres de carne de porco picada, frescos e cozinhados. Para tal, foi adicionado diretamente à carne de porco picada, o extrato da macroalga contendo 9,3% de laminarina e 7,8% de fucoídana a diferentes níveis (0,01, 0,1 e 0,5%) (m/m). Os hambúrgueres foram então armazenados durante 14 dias a 4°C em embalagens de atmosfera modificada contendo 80% O<sub>2</sub>:20% CO<sub>2</sub> e 70% de N<sub>2</sub>:30% CO<sub>2</sub>, respetivamente. Estes autores verificaram que a adição do extrato rico em laminarina e fucoídana não conduziu ao aumento dos parâmetros de qualidade nos hambúrgueres frescos. Por outro lado, a adição do extrato a 0,5% revelou capacidade para diminuir a oxidação lipídica nos hambúrgueres cozinhados, embora a sua aceitação fosse mais baixa do que o controlo. Já no extrato de laminarina/fucoídana de 0,01%, não foi notório qualquer efeito na cor, oxidação lipídica, textura ou aceitação sensorial, quando incorporado nos hambúrgueres.

Para além de produtos cárneos, também tem sido testado em peixe, sendo que um estudo realizado por Ortiz *et al.* (77), pretendeu avaliar o efeito na qualidade lipídica e sensorial, utilizando diferentes extratos aquosos das macroalgas *Durvillaea antarctica*, *Ulva lactuca*, *Pyropia columbina* como líquidos de cobertura em salmão enlatado. Após um período de 140 dias de armazenamento em conserva a 40°C, os autores verificaram que todos os tipos de amostra de peixe tinham um odor oxidante aceitável, assim como os valores de sabor característico. Ao utilizarem os extratos das macroalgas como parte do líquido de cobertura, foi possível diminuir a peroxidação secundária em salmão enlatado, quando comparado com a amostra controlo (sem a adição do extrato de macroalga). Para além disto, foi possível verificar baixos valores de odores oxidados. Em termos de parâmetros sensoriais, estes não foram significativamente diferentes entre os salmões enlatados com os diferentes líquidos de cobertura, estando sempre dentro dos limites aceitáveis.

Por último, também se tem desenvolvidos estudos em produtos como o leite, em que O'Sullivan *et al.* (78) estudaram a possibilidade de introduzir extrato de macroalga como ingrediente funcional. Para tal, prepararam extrato aquoso e etanol 80% (v/v) de *Ascophyllum nodosum* e etanol 60% (v/v) de *Fucus vesiculosus*. A introdução dos extratos

etanólicos da *A. nodosum* e *F. vesiculosus* na proporção de 0,25% e 0,50%, resultou num aumento do verdor e amarelamento das amostras de leite fortificadas. O extrato de etanol a 60% da *F. vesiculosus* revelou capacidade antioxidante no leite semelhante ao padrão de floroglucinol. Em termos de parâmetros microbiológicos, não verificaram qualquer efeito quer pelo tipo ou concentração de extrato, enquanto na análise sensorial, concluíram que o leite controlo e o leite contendo extrato preparado em água foram os mais aceitáveis pelo painel.

Tabela 7 – Efeito da incorporação dos extratos de macroalgas nas propriedades dos alimentos

<b>Tipo de produto</b>	<b>Tipo de macroalga</b>	<b>Quantidade adicionada</b>	<b>Tipo de efeito</b>	<b>Referência</b>
<b>Carne</b>	<i>P. palmata</i>	0,11%	↓ teor de sal do através da adição do extrato e modificando os parâmetros de aquecimento.	(75)
	<i>L. digitata</i>	Contendo laminarina (9,3%) e fucoidana (7,8%) a diferentes níveis (0,01, 0,1 e 0,5%)	O extrato laminarina/fucoidana não melhorou a qualidade dos hambúrgueres frescos. O extrato a 0,01% não afetou a cor, textura, oxidação lipídica ou aceitação sensorial. O extrato a 0,5% revelou a melhor capacidade para diminuir a oxidação lipídica dos hambúrgueres cozinhados.	(76)
<b>Peixe</b>	<i>D. antarctica</i> , <i>U. lactuca</i> , <i>P. columbina</i>	30 mL do líquido de cobertura preparado a partir de 500g de cada macroalga em 2L de água destilada	Extratos como parte do líquido de cobertura, permitiu diminuir a peroxidação lipídica do salmão enlatado. Apresentou baixos valores de odores oxidados.	(77)



Leite	<i>A. nodosum</i> e	0,25 e 0,50%	Extratos preparados com água	(78)
	<i>F. vesiculosus</i>		foram mais aceitáveis do que os etanólicos, quando incorporados no leite.	

## 1.2 OBJETOS DE ESTUDO

### 1.2.1 Macroalgas em foco: *F. vesiculosus* e *Gracilaria* sp.

As macroalgas castanhas são aquelas que parecem ser mais afetadas ao nível do desenvolvimento e morfologia, pelas condições ambientais, apresentando diferentes características na flora, em diferentes regiões geográficas (4).

A *F. vesiculosus* (Figura 1) é um exemplo de macroalga castanha, comumente encontrada em águas temperadas ao longo das costas rochosas das regiões litoral e sublitoral do hemisfério norte (79). Estruturalmente esta espécie apresenta um talo muito ramificado que cresce por ramificação dicotômica, sendo suportado por um caule pequeno e estreito, que está ligado a uma raiz em forma de disco. Nas ramificações existem segmentos achatados compostos por uma veia central proeminente e uma folha onde, normalmente, estão os criptoblastos, que são cavidades estéreis que facilitam a absorção de nutrientes da água do mar (5). Esta, é uma macroalga que apresenta alguns compostos com valor nutracêutico com potencial benefício para a saúde, nomeadamente ácidos gordos ómega 3 e 6 para a prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes; fucoxantina com atividade anti-inflamatória e anti-obesidade; florotaninos com atividade antioxidante e a fucoidana com efeito hipolipidémico (9). Graças à presença dos compostos funcionais, o género *Fucus* tem sido visto como um potencial ingrediente funcional com enorme interesse e aplicação, não só nas indústrias farmacêuticas e cosméticas, mas também nas indústrias alimentares (80).



Figura 1- Macroalga *F. vesiculosus* (Imagem da AlgaeBase)

Por outro lado, a *Gracilaria* sp. (Figura 2) é um exemplo de macroalga vermelha, tendo a capacidade de crescer numa ampla gama de salinidade, sendo por isso possível encontrá-la tanto em água salobra, como no mar (6). Estruturalmente, o talo cresce por meio de uma célula apical de dois lados e os ramos vão afunilando (5).

Normalmente, as macroalgas do género *Gracilaria* são cultivadas e colhidas com o intuito de produzir agar, sendo que, atualmente mais de 50% da fonte de agar provem desta macroalga. Em países como a China, Japão, Coreia e Tailândia, são utilizadas como alimento em sopas e saladas (6). Tal como nas macroalgas castanhas, as vermelhas possuem compostos que podem ter um potencial benéfico, como é o caso da ficoeritrina e ficocianina, que são normalmente associadas a propriedades antioxidantes; os polissacarídeos agar e carragenana, que não são digeridos pelo ser humano e podem por isso, ser considerados fibra dietética (9).



Figura 2- Macroalga do género *Gracilaria* (Imagem da AlgaeBase)

## 1.2.2 Alheira

Os enchidos são uma parte importante da gastronomia de diferentes países e são consumidos desde há muitos séculos em diferentes partes do mundo. A alheira é um produto fumado e fermentado de carne tradicional portuguesa, geralmente de porco e/ou aves, e pão, produzida no norte de Portugal (81).

Hoje em dia, as empresas apostam cada vez mais na inovação dos produtos alimentares através da utilização do conhecimento, como uma ferramenta estratégica de forma a desenvolver novos produtos e novas formulações. O interesse em produtos alimentares tradicionais inovadores parece estar relacionado com a possibilidade de se obter produtos mais saudáveis, embora com o risco associado da perda do sabor original (82).

Alguns estudos têm procurado demonstrar a possibilidade de mudar a imagem dos produtos de carne tradicionalmente aceitos, por uma que sugere um estilo de vida mais saudável através da adição de ingredientes específicos como é o caso de vegetais, extratos, fibras, entre outros. Assim, os produtos à base de carne podem ser modificados através da adição de ingredientes considerados benéficos para a saúde, reduzindo os componentes considerados prejudiciais à saúde (83,84). Com base nos factos referidos anteriormente, hoje em dia encontra-se disponível no mercado a alheira vegetariana, um enchido curado pelo fumo, constituído por proteínas vegetais extrusadas e pão, com condimentos e aditivos, sendo um produto com uma consistência firme, invólucro sem roturas e aderente à massa (85).



Figura 3 - Alheira vegetariana (Imagem da Innatura)



## 2. MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES

Água (H<sub>2</sub>O), Acetona, Etanol, Metanol (MetOH), Hidróxido de sódio (NaOH), Cloreto de sódio (NaCl), Ácido clorídrico (HCl), Ácido ascórbico, ácido gálico, BHA (2(3)-t-butil-4-hidroxianisol), Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS<sup>++</sup>), Tris (2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol), Carbonato de cálcio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Hexacianoferrato (III) de potássio (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), Cloreto de ferro (III) (FeCl<sub>3</sub>), Ácido tricloroacético (TCA), Ácido Tiobarbitúrico (TBA), K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> (persulfato de potássio), β-caroteno, clorofórmio, tween 80, ácido linoleico. Radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>). Reagente Folin-Ciocalteu, α-amilase a partir do *Aspergillus oryzae*, α-glucosidase a partir da *Saccharomyces cerevisiae*, α-D-glucopiranosídeo de 4-nitrofenilo (pNPG), lipase e co-lipase a partir do pâncreas, Éster 1,2-di-O-lauril-*rac*-glicero-3-(ácido glutarico 6-metilresorufinico) (DGGR), foram adquiridos junto da Sigma. Deoxicolato de sódio, taurodeoxicolato de sódio hidratado, captopril adquiridos junto da Acros. Orlistat adquirido na TCI e a acarbose na Fluka.

### 2.2 MACROALGAS *F. VESICULOSUS* E *GRACILARIA* SP.

As macroalgas *F. vesiculosus* (lote 0716) e *Gracilaria* sp. (lote 1416) foram cedidas pela empresa AlgaPlus. Após colheita, as macroalgas foram lavadas com água da ria tratada com radiação UV, seguidas de processo de secagem à temperatura de 25°C durante 16 horas. Após recepção no laboratório, as amostras foram congeladas e de seguida liofilizadas, de forma a facilitar o seu processo de moagem, que foi efetuado em moinho de café (Yellowline A10, 20000 rpm, IKA). Após moagem, as amostras de macroalga foram passadas num crivo com um tamanho de partícula < 0,25 mm. Os valores nutricionais destas macroalgas encontram-se discriminados na Tabela 8.

Tabela 8- Valor nutricional das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria* sp. (retirado do 1º relatório intercalar do SHARP)

(g/100g de macroalga seca)		Amostra	
		<i>F. vesiculosus</i>	<i>Gracilaria</i> sp.
<b>Proteína</b>		15,1±0,2	23,6±0,2
<b>Cinzas</b>		25,5±0,2	28,9±0,2
<b>Fibra</b>	<b>Solúvel</b>	7,6±0,3	22,8±1,3
	<b>Insolúvel</b>	37,4±0,3	17,9±3,3

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E QUÍMICA DE EXTRATOS DAS MACROALGAS *F. VESICULOSUS* E *GRACILARIA* SP.

### 2.3.1 Produção de extratos

As duas amostras de macroalgas, *F. vesiculosus* (F) e *Gracilaria* sp. (G), foram submetidas a quatro procedimentos diferentes de extração utilizando os seguintes solventes e condições numa proporção de 1:20 (m/v): (i) água destilada à temperatura ambiente durante 24 horas; (ii) água destilada a 90°C durante 30 minutos; (iii) etanol 80% (v/v) durante 24 horas à temperatura ambiente e (iv) acetona 70% (v/v) durante 24 horas à temperatura ambiente. Note-se que, a amostra de *Gracilaria* sp. não foi extraída com água destilada a 90°C devido ao seu elevado teor de ágar que interferiu posteriormente no passo de filtração. Após as extrações, todas as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos e filtradas através de um funil de placa porosa G4, seguido de remoção do solvente não aquoso e/ou concentração no evaporador rotativo a 40°C. Os extratos foram então congelados, liofilizados e armazenados a 4°C até à sua utilização.

### 2.3.2 Quantificação total de polifenóis

A quantificação total de polifenóis foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton *et al.* (86), com algumas adaptações. Na microplaca de 96 poços, adicionou-se 60 µL de água destilada, 15 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 15 µL de amostra ou padrão. Após 5 minutos, adicionou-se 150 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 7% (m/v). A microplaca foi incubada na estufa à temperatura de 30°C durante 60 minutos. Após este tempo, procedeu-se à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 750 nm num leitor de microplacas (Biotek). O ácido gálico foi utilizado como padrão para a curva de

calibração, numa gama de concentrações entre 0,05-0,26 mg/mL. A quantidade total de polifenóis foi expressa em gramas EAG/100 gramas de extrato.

### 2.3.3 Método de captação de radicais livres (DPPH<sup>•</sup>)

A avaliação do poder antioxidante dos extratos foi efetuada através do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>). Para tal, foi utilizada uma solução metanólica  $8,66 \times 10^{-5}$  M de DPPH<sup>•</sup> e os extratos preparados em eppendorfs em várias concentrações (entre 5 e 12 mg/mL). Colocou-se em tubos de ensaio diferentes quantidades da solução de amostra (21-200 µL), e completou-se o volume de 300 µL com água destilada. Numa microplaca de 96 poços, foi colocado 50 µL de cada uma das diluições dos extratos/padrão e 250 µL de solução de DPPH<sup>•</sup>. A microplaca foi guardada no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente e efetuou-se a leitura no leitor de microplacas a 517 nm.

O ácido ascórbico foi utilizado como padrão para a curva de calibração, numa gama de concentrações entre 0,004 e 0,030 mg/mL. O controlo foi efetuado na presença de todos os reagentes e na ausência do extrato.

A percentagem de inibição foi determinada para cada concentração através da fórmula representada na equação 1:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_c - Abs_e}{Abs_c} \times 100 \quad (1)$$

Abs<sub>c</sub>: Absorvância do controlo

Abs<sub>e</sub>: Absorvância do extrato após 30 minutos no escuro

Os resultados foram expressos em gramas EAA/100 gramas de extrato e em valor de IC<sub>50</sub> (i.e., concentração de extrato capaz de inibir 50% do radical DPPH<sup>•</sup>), no caso dos extratos da *F. vesiculosus*. Uma vez que não foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> nos extratos de *Gracilaria* sp., os resultados relativos a esta macroalga foram apresentados apenas em gramas EAA/100 gramas de extrato.

### 2.3.4 Método do Poder Redutor (FRAP)

A atividade do poder redutor foi determinada utilizando diferentes quantidades (50-267 µL) de uma solução aquosa de extrato (5-12 mg/mL) e o volume de 400 µL foi

completado com água destilada. Nos tubos de ensaio, colocou-se 200 µL de amostra/padrão, 200 µL de tampão fosfato (0,2M e pH 6,6), 200 µL de  $K_3Fe(CN)_6$  1% (m/v), agitando-se em seguida no vortex. Após 20 minutos num banho a 50°C, adicionou-se 200 µL de TCA e agitou-se novamente no vortex. Transferiu-se de cada tubo de ensaio para a microplaca de 96 poços, 75 µL da mistura anterior, 75 µL de água destilada e 15 µL de  $FeCl_3$  0,1% (m/v). Efetuou-se a leitura no leitor de microplacas (Biotek) a 700 nm. O BHA foi utilizado como padrão para a curva de calibração, numa gama de concentrações entre 0,03 e 0,12 mg/mL. O controlo continha todos os reagentes, exceto o extrato (substituído por solvente).

Os resultados relativos aos extratos da *F. vesiculosus* foram expressos em gramas EBHA/100 gramas de extrato e no valor de  $EC_{50}$  (µg/mL). Uma vez que não foi possível determinar o valor de  $EC_{50}$  para os extratos da *Gracilaria* sp., os resultados foram expressos apenas em gramas EAA/100 gramas de extrato.

### **2.3.5 Método da co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico**

Para a determinação da atividade inibitória contra a peroxidação lipídica, preparou-se uma solução de β-caroteno através da dissolução de 20 mg de β-caroteno em 10 mL de clorofórmio. De seguida, prepararam-se dois balões de 100 mL tendo-se colocado 1 mL de “tween 80” em cada um deles. A um dos balões foi adicionado 1 mL de clorofórmio, e no outro, 1 mL da solução de β-caroteno. Após remoção do clorofórmio (cerca de 45 minutos a 40°C no evaporador rotativo), adicionou-se 50 mg de ácido linoleico, sendo a solução homogeneizada no evaporador rotativo à velocidade máxima durante 1 minuto. De seguida, pesaram-se 100 gramas de água, tendo esta sido adicionada lentamente a cada mistura (cerca de 20 mL de cada vez, seguindo-se de homogeneização no evaporador rotativo à velocidade máxima, durante 5 minutos).

Alíquotas de 800 µL das emulsões acima preparadas foram transferidas para diferentes tubos de ensaio contendo 200 µL de extratos de diferentes concentrações. Assim que as emulsões foram adicionadas, foi retirada uma alíquota de 200 µL da amostra/padrão para uma microplaca de 96 poços, sendo efetuada a leitura do tempo zero, num leitor de microplacas (Biotek) a 470 nm. Após este procedimento, os tubos foram colocados num banho a 50°C durante 2 horas. Após este período, a reação foi parada colocando os tubos num banho de gelo, tendo-se retirado uma alíquota de 200 µL para nova leitura a 470 nm no



leitor de microplacas. A atividade antioxidante foi calculada através da fórmula representada na equação 2:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{((C_{t=0} - C_{t=2}) - (E_{t=0} - E_{t=2}))}{(C_{t=0} - C_{t=2})} \times 100 \quad (2)$$

$C_{t=0}$  = Controlo no tempo inicial

$C_{t=2}$  = Controlo ao fim de 2 horas

$E_{t=0}$  = Extrato/padrão no tempo inicial

$E_{t=2}$  = Extrato/padrão ao fim de 2 horas

A concentração do extrato que proporcionou 50% da atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição *versus* concentração do extrato. O BHA foi utilizado como padrão para a curva de calibração, numa gama de concentrações entre 0,80 e 3,99  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2.4 CAPACIDADE DOS EXTRATOS NA INIBIÇÃO DE ENZIMAS

### 2.4.1 Atividade da $\alpha$ -amilase

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi medida de acordo com Wickramaratne *et al.* (87), com algumas modificações. Os extratos das macroalgas foram dissolvidos em tampão fosfato (20 mM, pH 6,9, contendo 6 mM de NaCl) a uma concentração de 30 mg/mL e centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos para remoção do material insolúvel. 200  $\mu\text{L}$  de extrato foram adicionados a 400  $\mu\text{L}$  de solução de amido 0,8% (m/v) no mesmo tampão fosfato e a mistura foi incubada durante 5 minutos a 37°C, seguida da adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução  $\alpha$ -amilase. Após 5 minutos de incubação, foram recolhidos 200  $\mu\text{L}$  da mistura reacional e imediatamente misturados com 600  $\mu\text{L}$  de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 10 g/L, 300 g/L de tartarato de potássio e de sódio e 0,4M de NaOH) para parar a reação. Uma segunda alíquota de 200  $\mu\text{L}$  foi adicionalmente recolhida após 15 minutos e misturada com o reagente de DNS. As amostras foram então fervidas durante 10 minutos e arrefecidas antes de ler a sua absorvância a 450 nm. A acarbose foi utilizada como controlo positivo da inibição.

### **2.4.2 Atividade da $\alpha$ -glucosidase**

A atividade da  $\alpha$ -glucosidase foi medida de acordo com Sakar *et al.* (88), com algumas modificações. Os extratos das macroalgas foram dissolvidos em tampão fosfato (50 mM, pH 6,8) a uma concentração de 30 g/mL e centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos para remover o material insolúvel. 50  $\mu$ L de extrato foram misturados com 50  $\mu$ L de pNPG 6 mM, dissolvidos em água destilada, seguindo-se da adição de 100  $\mu$ L de solução de  $\alpha$ -glucosidase. A microplaca foi incubada durante 20 minutos a 37°C e a absorvância foi medida a cada 60 segundos a 405 nm. A acarbose foi utilizada como um controlo positivo da inibição.

### **2.4.3 Atividade da lipase pancreática**

A atividade da lipase foi medida de acordo com o procedimento descrito por Panteghini *et al.* (89), com algumas modificações. Os extratos das macroalgas foram dissolvidos em tampão Tris (50 mM, pH 8,4) a uma concentração de 30 mg/mL e centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos para remover o material insolúvel. A mistura de reação foi preparada num microtubo, misturando 55  $\mu$ L de extrato com 385  $\mu$ L de solução A (tampão Tris 50 mM, pH 8,4, contendo 1,8 mM de desoxicolato de sódio e 1,0  $\mu$ g/mL de colipase) e 82,5  $\mu$ L de solução B (tampão acetato (18 mM, pH 4,5): isopropanol (3:2) (v/v) com 0,2 mM de cloreto de cálcio), 72 mM de taurodesoxicolato de sódio e 136  $\mu$ M de DGGR. A reação foi iniciada pela adição de 27,5  $\mu$ L de solução de lipase e rapidamente transferida para uma microplaca de 96 poços. A microplaca foi incubada durante 35 minutos a 37°C e a absorvância foi medida a cada 60 segundos a 580 nm. Orlistat foi usado como um controlo positivo de inibição.

## **2.5 ANÁLISE NUTRICIONAL DOS EXTRATOS**

### **2.5.1 Teor de humidade**

Para determinar o teor de humidade, pesou-se os cadinhos previamente secos na estufa (2 horas a 105 °C). De seguida, colocou-se cerca de 2 gramas de amostra em cada um dos cadinhos e levou-se à estufa a uma temperatura de 105 °C durante a noite (cerca de 10-12 horas). Após o arrefecimento dos cadinhos em exsiccador, efetuou-se a respetiva pesagem, permitindo obter a percentagem de humidade da amostra.

### **2.5.2 Teor de cinzas**

Para a determinação das cinzas, a amostra anteriormente utilizada para a determinação da humidade, foi levada à mufla a uma temperatura de 550°C durante 6 horas. Após o arrefecimento dos cadinhos em exsiccador, foi registada a massa do resíduo obtido e calculada a percentagem de cinzas na amostra.

### **2.5.3 Teor de proteína**

O teor proteico foi determinado por análise elementar da %N, através da condutividade térmica, utilizando um analisador Truspec 630-200-200. O teor de proteína foi calculado utilizando o fator de conversão 6,25.

### **2.5.4 Teor de fibra dietética**

Para a determinação do teor de fibra solúvel e insolúvel, recorreu-se ao “*total dietary fiber assay kit*” da Megazyme. Pesou-se 1 g de cada extrato num erlenmeyer e de seguida, adicionou-se 40 mL de solução tampão MES-TRIS (pH 8,2), 50 µL de enzima α-amilase e um agitador magnético, colocando-se posteriormente o erlenmeyer num banho de água fervente por um período de 30 minutos (contabilizado a partir do momento em que a água começou a ferver). Os erlenmeyers foram depois retirados do banho e colocados a arrefecer até à temperatura de 60°C. Em seguida, adicionou-se 10 mL de água destilada e após estabilização da temperatura a 60°C, foi adicionado 100 µL da enzima protease, deixada a incubar por um período de 30 minutos. Após este período, foi adicionado 5 mL de 0,56N HCl, 6 gotas de HCl 5% e 200 µL da enzima amiloglucosidase. A enzima foi incubada por um período de 30 minutos (contabilizado a partir do momento em que a temperatura do banho estabilizou nos 60°C).

Para a determinação da fibra dietética insolúvel e solúvel, utilizou-se os cadinhos com cerca de 1 g de celite previamente secos na estufa durante a noite a 105°C e tarados. No caso da fibra dietética insolúvel, foi efetuada uma filtração a vácuo com o cadinho contendo a celite, acoplado a um kitasato. Inicialmente adicionou-se cerca de 5 mL de água de forma a redistribuir a celite pelo cadinho. Após este procedimento, a amostra foi filtrada, sendo o resíduo do cadinho lavado duas vezes com 10 mL de água destilada pré-aquecida a 70 °C.

Os cadinhos contendo o resíduo foram depois lavados duas vezes com 10 mL de etanol 95% e com 10 mL de acetona.

Para a fibra dietética solúvel, o líquido recuperado (filtrado e lavagens de água) foi colocado num novo erlenmeyer onde foi adicionado etanol 95% a uma temperatura de 60 °C numa proporção de quatro vezes o volume do líquido recuperado, deixado em seguida a precipitar à temperatura ambiente durante uma hora. Após este passo, foi efetuada uma filtração a vácuo com o cadinho contendo a celite, acoplado a um kitasato. Inicialmente adicionou-se cerca de 15 mL de etanol 78% de forma a redistribuir a celite pelo cadinho. A amostra foi filtrada e os cadinhos com o resíduo foram lavados duas vezes com cerca de 15 mL com etanol 78%, etanol 95% e acetona.

Todos os cadinhos contendo a fibra solúvel e insolúvel, foram colocados durante a noite na estufa a uma temperatura de 105°C. No dia seguinte, foram retirados para um exsiccador e posteriormente pesados. Após a pesagem, o conteúdo dos cadinhos (amostra+celite) foi homogeneizado num almofariz, de forma a retirar cerca de 2 mg para análise de proteína. A restante amostra foi colocada novamente no cadinho, e colocados a incinerar na mufla a 525°C durante 5 horas. Após este período, os cadinhos foram retirados para o exsiccador e foram pesados. A percentagem de fibra dietética solúvel e insolúvel foi calculada através das fórmulas representadas nas equações 3 e 4, respetivamente:

$$\text{Fibra dietética solúvel (\%)} = \frac{M_s - P_s - C_s}{M_a} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Fibra dietética insolúvel (\%)} = \frac{M_i - P_i - C_i}{M_a} \times 100 \quad (4)$$

Onde,  $M_a$  representa a massa de amostra,  $M_s$  representa a massa do resíduo solúvel,  $P_s$  massa de proteína da fibra solúvel, e  $C_s$  massa de cinza solúvel,  $M_i$  representa a massa do resíduo insolúvel,  $P_i$  massa de proteína da fibra insolúvel, e  $C_i$  massa de cinza insolúvel.

### 2.5.5 Teor de açúcares livres

Para a determinação dos açúcares livres, foi preparada uma solução aquosa dos extratos numa concentração próxima de 5 mg/mL. A 100  $\mu$ L de amostra/padrão adicionou-se 50  $\mu$ L de fenol 4% e logo de seguida, juntou-se 250  $\mu$ L de ácido sulfúrico 96%.

Transferiu-se para a microplaca de 96 poços, 200  $\mu$ L da mistura anterior, sendo depois incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. A leitura foi efetuada num leitor de microplacas a 490 nm. A glucose foi utilizada como padrão para a curva de calibração, numa gama de concentrações de 0,10 a 0,51 mg/mL. A quantidade de açúcares livres foi expressa em mg de açúcares totais/100 mg de extrato.

## 2.6 PRODUÇÃO DA ALHEIRA VEGETARIANA COM OS EXTRATOS AQUOSOS DE *F. VESICULOSUS*

Os extratos de água à temperatura ambiente e água quente da *F. vesiculosus* foram utilizados como ingrediente na produção de alheiras vegetarianas. Em geral, a preparação destes extratos foi idêntica à descrita na secção 2.3.1, com exceção da filtração em funil de placa porosa G4, que foi substituída por filtração em tecido de *nylon*, e da eliminação do passo de concentração de solvente e liofilização.



Figura 4 - Extrato de água quente (esquerda) e à temperatura ambiente (direita) da macroalga *F. vesiculosus*

A produção da alheira vegetariana (Figura 5) foi realizada durante o processo de fabricação da mesma, na empresa Irmãos Monteiro, S.A, sediada na Gafanha de Encarnação, em Aveiro. No total, foram produzidas a) amostras controlo, que consistiam na formulação base de alheira vegetariana comercializada pela empresa (A\_C); b) formulação base enriquecida com extrato de água à temperatura ambiente a 0,4% (m/m peso húmido) (A\_ETA); c) formulação base enriquecida com extrato de água quente a 0,4% (m/m peso

húmido) (A\_EQ). Após a produção das amostras com e sem extrato (amostra controlo), estas ficaram armazenadas na câmara fria da empresa até ao início da sua análise (15 dias depois).



Figura 5 - Produção da alheira vegetariana na empresa Irmãos Monteiro, S.A

## 2.7 CARACTERIZAÇÃO DA ALHEIRA VEGETARIANA

### 2.7.1 Análises físico-químicas

#### Determinação da cor

A cor ( $\Delta E$ ) das alheiras foi medida usando um colorímetro digital, previamente calibrado com o prato-branco modelo. Foi emitido um feixe de luz no espectro visível sobre a superfície das alheiras. A operação foi realizada em vários pontos aleatórios.

O valor da cor foi definido através da fórmula representada na equação 5:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (5)$$

$\Delta L$  – Diferença da luminosidade registada entre o valor da alheira com o extrato e o valor da alheira controlo;

$\Delta a$  – Diferença do valor da alheira com o extrato correspondente ao eixo “a” e o da alheira controlo para este eixo;

$\Delta b$  – Diferença do valor da alheira com o extrato correspondente ao eixo “b” e o da alheira controlo para este eixo.

### Índice de acastanhamento

O índice de acastanhamento (IA) foi determinado pelas coordenadas CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), por utilização da expressão representada na equação 6, que são normalmente utilizadas para frutos e vegetais (90).

$$IA = \frac{[100 \times (X - 0,31)]}{0,17} \quad \text{onde } X = \frac{a^* + 1,75 \times L^*}{(5,645 \times L^* + a^* - 3,012 \times b^*)} \quad (6)$$

### Teor de humidade, cinzas e proteína

A determinação do teor de humidade, cinzas e proteína foi efetuada de acordo com os procedimentos descritos nas secções, 2.5.1, 2.5.2 e 2.5.3, respetivamente.

### Determinação da acidez titulável e pH

A determinação da acidez titulável foi efetuada segundo o método descrito na Associação de Químicos Agrícola Oficial (AOAC) (1998). Para tal, homogeneizaram-se 5 g de cada amostra em 45 mL de água destilada fervida, usando um Ultra-Turrax a 12000 rpm durante 1 minuto. A mistura, foi de seguida centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos à temperatura de 20°C e o sobrenadante foi filtrado através de funil de placa porosa G4. A leitura do pH foi realizada no filtrado obtido. Depois de se efetuar a leitura do pH, o filtrado foi titulado com uma solução padrão 0,1M NaOH, na presença de algumas gotas de fenolfetalina (1%) como indicador. Os resultados da acidez titulável foram expressos em percentagem de acidez láctica, calculada através da fórmula representada na equação 7:

$$A. \text{ láctica} = \frac{\text{mL base titulável} \times \text{normalidade da base} \times \text{eq. acidez}}{\text{volume de amostra (mL)}} \times 100 \quad (7)$$

#### **2.7.2 Avaliação de teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante**

A quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante, foi realizada a partir de um extrato metanólico. O extrato foi efetuado através da adição de 20 mL de MeOH com 1% de ácido acético a 2 g de alheira num copo, durante 1 hora sob agitação a 200 rpm. Após este período de tempo, o conteúdo foi colocado durante 1 hora no congelador, sendo

depois centrifugado a 6000 rpm a uma temperatura de 4°C, durante 20 minutos. De seguida, foi efetuada uma filtração sob vácuo com um funil de placa porosa G4. O filtrado recuperado foi transferido para um balão e concentrado no evaporador rotativo até à secura da amostra. A amostra foi depois ressuspensa em 3 mL de MeOH com 1% de ácido acético.

A quantificação dos compostos fenólicos foi efetuada como descrito na secção 2.3., enquanto a atividade antioxidante, foi determinada através do método do catião radical ABTS<sup>•+</sup>.

O catião ABTS<sup>•+</sup> foi gerado pela reação de ABTS (7 mM) numa solução de K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> (2,45 mM) mantida no escuro cerca de 12 horas. A solução de ABTS<sup>•+</sup> foi depois diluída em água (1:80mL) e a absorvância a 734 nm ajustada entre 0,750-0,800. Os extratos de alheira (dissolvidos em MeOH com 1% de ácido acético) foram preparados numa gama de concentrações entre 28 e 38 mg/mL. De seguida, adicionou-se em *eppendorfs* várias quantidades da solução de extrato (50-100 µL), sendo completado o volume de 500 µL com MeOH com 1% de ácido acético. Numa microplaca de 96 poços, foi colocado 50 µL de cada uma das diluições dos extratos/padrão e 250 µL de solução de ABTS<sup>•+</sup>. A microplaca foi deixada durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente, sendo em seguida efetuada a leitura no leitor de microplacas (Biotek) a 734 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão para a curva de calibração, numa gama de concentrações de 0,004 e 0,030 mg/mL. O controlo foi efetuado na presença de todos os reagentes e na ausência do extrato.

A percentagem de inibição foi determinada para cada concentração através da fórmula representada na equação 8:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_c - Abs_E}{Abs_c} \times 100 \quad (8)$$

Abs<sub>c</sub>: Absorvância do controlo

Abs<sub>E</sub>: Absorvância do extrato após 30 minutos no escuro

### 2.7.3 Estado de oxidação

Para a realização da medição dos níveis de oxidação utilizou-se o método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Pesou-se 2 g de cada amostra e homogeneizou-se tudo com a ajuda de um Ultra-Turrax em 10 mL de TCA (5%). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2100 G durante 20 minutos à temperatura de 20°C. Após a



centrifugação, foi efetuada uma filtração a vácuo com um funil de placa porosa G4 acoplado a um kitasato. O filtrado final de cada amostra foi utilizado na reação com o TBA.

Nos tubos de ensaio devidamente identificados, colocou-se 500 µL de filtrado (amostra) e 500 µL de TBA (20mM). Em simultâneo preparou-se o branco, adicionou-se num outro tubo de ensaio 500 µL de TCA (5%) e 500 µL TBA (20 mM). Os resultados foram expressos em mg malonaldeído (MDA)/kg de amostra. Para converter estes resultados de absorvância em mg MDA/kg, efetuou-se uma curva de calibração de MDA, que serve de padrão. Assim, efetuou-se em simultâneo aos ensaios, a curva de calibração/padrão: em 7 tubos de ensaio adicionou-se respetivamente 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µL de MDA (2,29 µg/mL), 400, 350, 300, 250, 200, 150 e 100 µL de TCA (5%), 500 µL de TBA (20 mM) e homogeneizou-se no vortex. Seguidamente, os tubos de ensaio com as preparações foram colocados num banho a 100°C durante 40 minutos para ativar a reação. Após este período de tempo foi efetuada uma leitura no leitor de microplacas a 530 nm.

#### **2.7.4 Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada na empresa Irmãos Monteiro SA e na Universidade de Aveiro com um grupo de provadores não treinados, englobando funcionários da empresa, estudantes, docentes e pessoal não docente, com um intervalo de idades entre os 19 e 59 anos. Esta análise foi realizada ao fim de 4 semanas após a produção da alheira. Este período encontra-se dentro da data do prazo de validade referido e estimado pela empresa produtora da alheira.

A avaliação envolveu diversos parâmetros, nomeadamente: a cor, sabor, textura e aroma. Para a realização do teste, a alheira foi grelhada e dividida em pedaços. A escala utilizada para a classificação dos testes sensoriais foi a seguinte: 1- desgosto muito; 2- desgosto; 3- não gosto nem desgosto; 4- gosto; 5 – gosto muito.

### **2.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS**

Os resultados obtidos nos métodos realizados foram submetidos a uma análise de variância (One-way ANOVA), utilizando o *software* “*GraphPad Prism 6*”. Seguidamente, no tratamento dos resultados realizou-se o teste de Tukey a todos os parâmetros para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados das amostras testadas. Todos os testes foram analisados com um nível de confiança de 95%.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DAS MACROALGAS *F. VESICULOSUS* E *GRACILARIA SP.*

##### 3.1.1 Rendimentos da liofilização

Após a produção dos diferentes extratos das macroalgas F e G, estes foram liofilizados por motivos de conservação da amostra e posterior caracterização química, sendo possível calcular os respectivos rendimentos (Figura 6). De entre os vários extratos, os aquosos eram os mais representativos em termos de massa. Os extratos de água à temperatura ambiente da F e da G representaram  $27,8 \pm 2,3\%$  e  $30,7 \pm 1,4\%$ , respetivamente, e o extrato de água quente da F representou  $30,5 \pm 0,8\%$ . No caso da G não foi possível produzir o extrato em água quente, uma vez que devido à elevada quantidade de agar, este gelificava durante o processo, impossibilitando a sua filtração. Os extratos de etanol a 80% e acetona a 70% foram os que revelaram menores rendimentos, apresentando  $15,3 \pm 1,8\%$  e  $18,2 \pm 0,9\%$  no caso da F, e  $23,3 \pm 0,8\%$  e  $23,2 \pm 1,6\%$  na G.

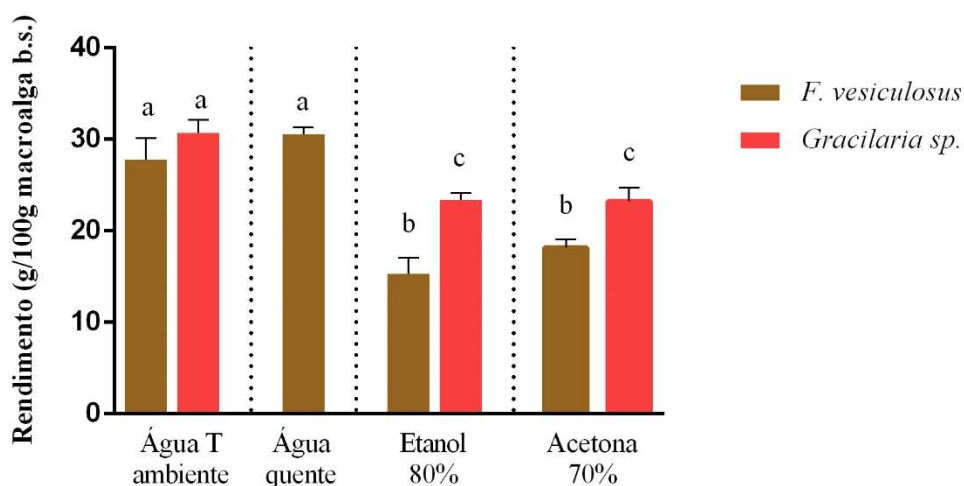


Figura 6 - Rendimentos dos extratos liofilizados obtidos a partir das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*, expresso em g de extrato/100 g de macroalga em base seca. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

De forma geral, a utilização de extratos ao nível da indústria alimentar e/ou de nutracêuticos tem por base a sua funcionalidade, sendo a atividade antioxidante uma das

mais exploradas, dada a sua importância para contrariar/prevenir as condições do *stress* oxidativo, que por sua vez, está associado a inúmeras condições patológicas como por exemplo as doenças inflamatórias e até mesmo a obesidade e diabetes. Nos dias de hoje, estes dois últimos problemas são uma realidade e por isso, existe a necessidade de se efetuar um rastreamento de extratos para o combate, nomeadamente através da inibição das enzimas  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase na diabetes e a lipase na obesidade.

### 3.1.2 Quantificação total de compostos fenólicos

Os valores obtidos para a determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos de F e G, expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de extrato (g EAG/100g de extrato), encontram-se representados na Figura 7. Os resultados aí representados, permitem perceber que o tipo de macroalga e solvente influenciaram as extrações dos CFT.

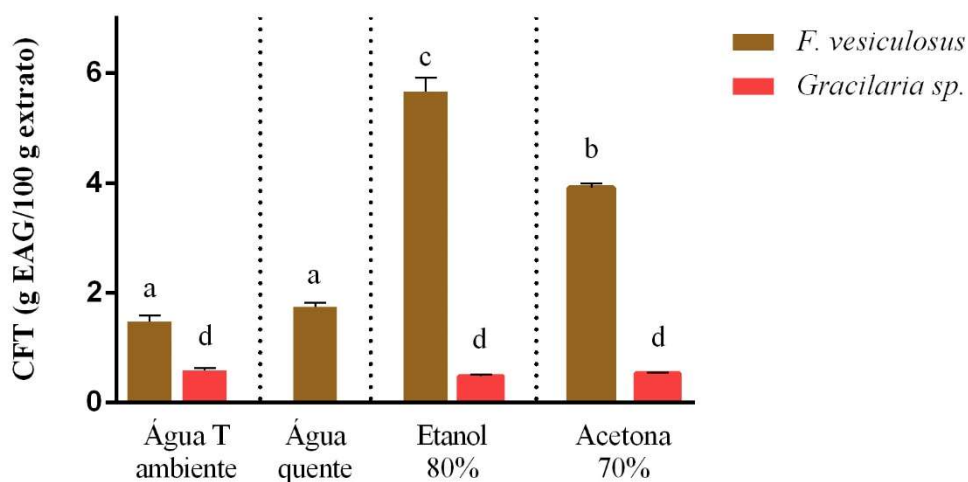


Figura 7 - Teor de compostos fenólicos totais (g EAG/100 g de extrato) dos extratos das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No geral, os extratos de F eram mais ricos em compostos fenólicos do que os obtidos na G, o que está de acordo com os dados descritos na literatura (91). Estes resultados, provavelmente estão relacionados com os florotaninos presentes em abundância nas

macroalgas castanhas, e que alguns estudos têm evidenciado ser o único grupo de compostos fenólicos detetado neste filo (92,93).

No que diz respeito à F, os extratos em que se conseguiu obter uma maior quantidade destes compostos foram produzidos com uma mistura aquosa de solventes orgânicos, mais concretamente, etanol a 80% e acetona a 70% com valores de  $5,7\pm 0,3$  e  $3,9\pm 0,1$  g EAG/100g de extrato, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Wang *et al.*(91), mostrando que os compostos fenólicos por norma são mais solúveis em solventes orgânicos polares do que em água. No caso dos extratos obtidos por solventes aquosos (água quente e água à temperatura ambiente), obteve-se  $1,7\pm 0,1$  e  $1,5\pm 0,1$  g EAG/100g de extrato, respetivamente. No respeitante aos extratos de G, os valores obtidos foram muito semelhantes tanto no extrato de água à temperatura ambiente, etanol a 80% e acetona a 70%, com os valores de  $0,6\pm 0,03$ ,  $0,5\pm 0,03$  e  $0,5\pm 0,01$  g EAG/100g de extrato, respetivamente.

### **3.1.3 Avaliação do poder antioxidante pelo método de DPPH'**

O método do DPPH' consiste em avaliar a capacidade antioxidante através da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH'). Este radical tem uma coloração púrpura, que na presença dos polifenóis conduzem a uma reação de descoloração (94).

Analisando a Figura 8, é possível observar que a capacidade sequestradora de DPPH', ocorreu com maior eficiência nos extratos produzidos a partir da F. Note-se que, tal como na quantificação dos compostos fenólicos totais, os extratos hidroetanólicos e hidroacetónicos foram os mais eficientes, apresentando valores de  $2,6\pm 0,3$  e  $1,5\pm 0,1$  g EAA/100 g de extrato, respetivamente. Em relação aos extratos aquosos (à temperatura ambiente e quente), a sua capacidade sequestradora de radicais foi semelhante entre si, tendo apresentado valores de  $0,6\pm 0,06$  e  $0,8\pm 0,1$  g EAA/100 g de extrato, respetivamente.

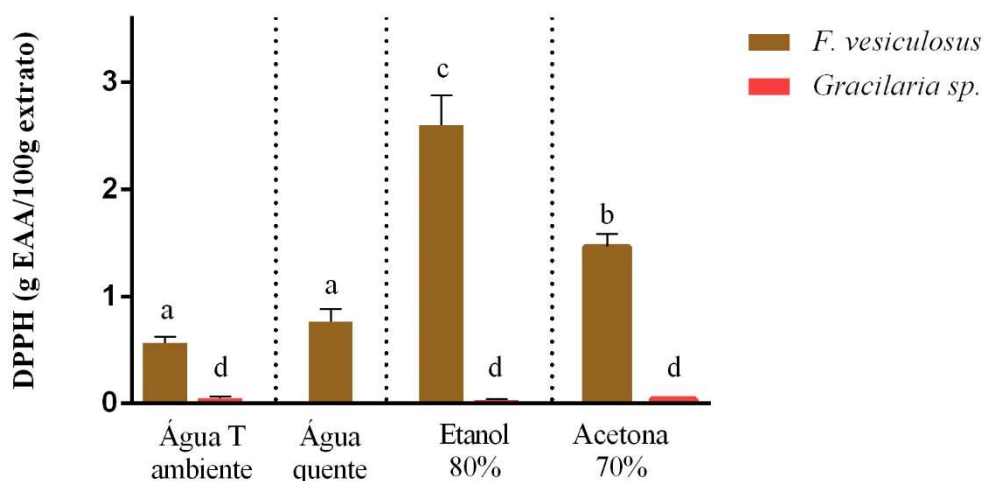


Figura 8 - Potencial antioxidante dos extratos das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*, avaliado pelo método de DPPH' (g EAA/100 g de extrato). Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Quando comparados com os extratos da F, os resultados referentes aos extratos da G demonstraram ser bastante menos promissores (cerca de  $0,1 \pm 0,01$  g EAA/100 g de extrato de água à temperatura ambiente e  $0,04 \pm 0,0$  g EAA/100 g de extrato de etanol a 80% e acetona 70%), não sendo possível efetuar o cálculo do respetivo valor de IC<sub>50</sub>. Assim, na Tabela 9 encontram-se apenas os valores de IC<sub>50</sub> para os extratos da F. O extrato de etanol a 80% é o que apresenta o valor mais baixo de IC<sub>50</sub> ( $99,0 \pm 7,2$  µg/mL), contudo, este não é significativamente diferente quando comparado com o extrato de acetona a 70%. Estes valores correspondem a aproximadamente 70 vezes o do ácido ascórbico (antioxidante de referência).

No global, os resultados apresentados sugerem uma associação entre os valores de CFT e a capacidade antirradicalar dos extratos. Resultados semelhantes foram obtidos por Jiménez-Escrig *et al.* (95), em que verificaram que as macroalgas castanhas em estudo, entre as quais a F, apresentam melhor capacidade sequestradora de radical DPPH' do que as macroalgas vermelhas.

Tabela 9 – Valores de IC<sub>50</sub> obtidos pelo método do DPPH\* para os extratos da *F. vesiculosus* e ácido ascórbico

Macroalga/Antioxidante sintético	Extratos	IC <sub>50</sub> extratos (µg/mL)
<i>F. vesiculosus</i>	Água T. ambiente	1074,9±57,2 <sup>a</sup>
	Água quente	443,9±41,6 <sup>b</sup>
	Etanol a 80%	99,0±7,2 <sup>c</sup>
	Acetona a 70%	113,5±4,4 <sup>c</sup>
Ácido ascórbico	-	3,2±0,3 <sup>d</sup>

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

### 3.1.4 Avaliação da capacidade antioxidante pelo método do poder redutor (FRAP)

O método do poder redutor é também um dos métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante. Em condições ácidas e na presença de antioxidantes, estes podem reduzir o Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, sendo que, o Fe<sup>2+</sup> liga-se ao ferrocianeto dando origem a uma coloração azul da prússia (96). Os resultados obtidos para os vários extratos de F e G encontram-se representados na Figura 9, expressos em g EBHA/100g de extrato.

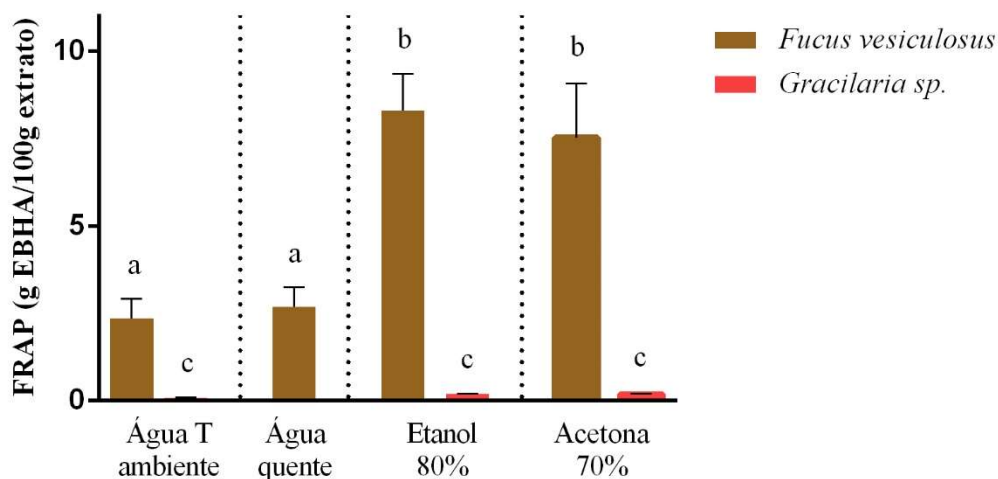


Figura 9 - Potencial antioxidante dos extratos das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*, avaliado pelo método de FRAP (g EBHA/100 g de extrato). Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Por observação da Figura 9 é notório, que tal como no ensaio de DPPH\*, os extratos da F apresentaram uma eficiência muito mais elevada quando comparados com os da G. Neste teste, não se verificou diferenças significativas nos extratos de etanol a 80% e acetona a 70%, apresentando valores de  $8,3\pm 1,0$  e  $7,5\pm 1,6$  g EBHA/100 g de extrato, respetivamente. Os extratos aquosos apresentaram valores mais baixos em comparação com os de mistura aquosa de solventes orgânicos, mais concretamente  $2,4\pm 0,6$  e  $2,7\pm 0,6$  g EBHA/100 g de extrato de água à temperatura ambiente e quente, respetivamente. No que respeita aos extratos da G, os valores dos três extratos variaram numa gama de 0,08-0,2 g EBHA/100 g de extrato, não sendo possível calcular o valor de EC<sub>50</sub> (concentração de extrato que atinge 0,5 de absorvância) para estes extratos.

Assim, observando a Tabela 10, é possível analisar os valores de EC<sub>50</sub> obtidos para os extratos da F. Estes resultados revelaram que o extrato etanol a 80% apresentou o melhor valor de EC<sub>50</sub> ( $0,29\pm 0,03$  mg/mL), contudo, sem diferença significativa para o extrato de acetona a 70%, sendo estes valores aproximadamente 10 vezes superiores ao antioxidante BHA. Em relação aos aquosos, apresentaram os valores de EC<sub>50</sub> mais elevados, também sem diferenças significativas entre si. Note-se que, os resultados aqui apresentados estão em concordância com outros estudos desenvolvidos por Jiménez-Escrig *et al.* (95) e O'Sullivan *et al.* (97), em que a espécie F foi a que exibiu maior atividade de FRAP.

Tabela 10 - Valores de EC<sub>50</sub> obtidos pelo método de FRAP para os extratos de *F. vesiculosus* e para o BHA.

Macroalga/Antioxidante sintético	Extratos	EC <sub>50</sub> extratos (mg/mL)
<i>F. vesiculosus</i>	Água T. ambiente	$0,93\pm 0,08^a$
	Água quente	$0,85\pm 0,10^a$
	Etanol 80%	$0,29\pm 0,03^b$
	Acetona 70%	$0,32\pm 0,06^b$
<b>BHA</b>		$0,03\pm 0,01^c$

Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )



### 3.1.5 Avaliação da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O método antioxidante do  $\beta$ -caroteno é realizado a partir de uma emulsão de ácido linoleico e  $\beta$ -caroteno, onde são gerados radicais livres por auto-oxidação do ácido linoleico sob a ação de temperatura. Estes radicais atacam as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, levando à perda do seu cromóforo e consequentemente à descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução (98). Atendendo à maior complexidade de execução deste teste, e à simultânea dificuldade legislativa inerente à aplicação de extratos hidroacetônicos como ingredientes alimentares, a potencialidade antioxidante destes extratos não foi avaliada por este teste (99).

Analisando a Figura 10, é notório os baixos valores obtidos pelos extratos de água à temperatura ambiente e etanol 80% da G, com uma gama a variar entre 0,01-0,02 g EBHA/100 g de extrato, respetivamente, não existindo por isso diferenças significativas entre si. Por outro lado, os extratos da F exibiram uma maior proteção da oxidação com valores de  $0,72\pm 0,04$ ,  $0,50\pm 0,04$  e  $0,47\pm 0,03$  g EBHA/100 g de extrato, para acetona 70%, água à temperatura ambiente e água quente, respetivamente.

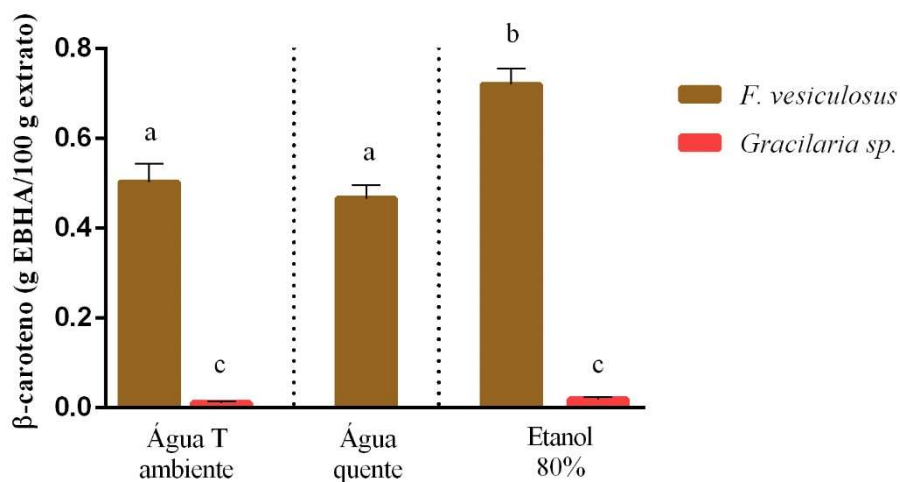


Figura 10 - Potencial antioxidante dos extratos das macroalgas *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*, avaliado pelo método da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (g EBHA/100 g de extrato). Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 11 encontram-se os valores de  $IC_{50}$  apenas dos extratos da macroalga F, uma vez que não foi possível determinar os da G. Assim, analisando em maior detalhe, os extratos de água à temperatura ambiente e quente apresentaram valores de  $IC_{50}$  mais

elevados e sem diferenças significativas entre si, enquanto o de etanol a 80% foi o que exibiu a melhor capacidade antioxidante ( $19,71 \pm 6,80 \mu\text{g/mL}$ ), sendo este valor aproximadamente 47 vezes superior quando comparado ao antioxidante BHA.

Tabela 11 – Valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para os extratos de *F. vesiculosus* e BHA.

Macroalga/Antioxidante	Extratos	$\text{IC}_{50}$ extratos ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>F. vesiculosus</i>	Água T. ambiente	$36,80 \pm 6,15^a$
	Água quente	$52,61 \pm 6,81^a$
	Etanol a 80%	$19,71 \pm 6,80^b$
<b>BHA</b>		$0,42 \pm 0,02^c$

Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

Para a avaliação da inibição enzimática dos extratos, as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase foram utilizadas, dado o seu papel importante no metabolismo de carboidratos. Dos extratos em análise, nenhum mostrou atividade inibitória em relação à  $\alpha$ -amilase até concentrações de  $7,5 \text{ mg/mL}$  (dados não mostrados). No entanto, os extratos da F revelaram-se capazes de inibir a enzima  $\alpha$ -glucosidase, com diferentes níveis de eficácia, sendo a do extrato de acetona a 70% ( $\text{IC}_{50} = 0,032 \text{ mg/mL}$ ) e o de água à temperatura ambiente ( $\text{IC}_{50} = 0,538 \text{ mg/mL}$ ) comparável à do fármaco acarbose ( $\text{IC}_{50} = 0,264 \text{ mg/mL}$ ) (Tabela 12). Assim, estes resultados revelaram o potencial dos extratos da F em inibir fortemente a  $\alpha$ -glucosidase, especialmente os obtidos com água à temperatura ambiente, demonstrando a possibilidade da sua utilização na diabetes através do controlo dos níveis de glicemia e reduzindo o conteúdo calórico assimilável dos alimentos sem alterar a formulação, além da adição do extrato. Isto, está de acordo com estudos realizados anteriormente por Gabbia *et al.* (100) e Roy *et al.* (101) onde analisaram o efeito sobre a  $\alpha$ -glucosidase de extratos de polifenóis comercialmente disponíveis, com  $\text{IC}_{50}$  de  $0,604 \mu\text{g/mL}$  e  $5 \mu\text{g/mL}$ , respetivamente, obtidos com água quente, mas purificados adicionalmente com ultrafiltração.

Tabela 12 - Atividade inibitória dos extratos *F. vesiculosus* e *Gracilaria* sp. na  $\alpha$ -glucosidase e lipase.

Amostra	Solvente	$\alpha$ -Glucosidase	Lipase
		IC <sub>50</sub> (mg/mL) / % inibição ([extrato] (mg/mL))	
<i>F. vesiculosus</i>	Água T. Ambiente	0,538 <sup>b</sup>	25,0% (3,05)
	Água quente	2,31 <sup>c</sup>	15,2% (2,99)
	Etanol a 80%	ni	ni
	Acetona a 70%	0,032 <sup>a</sup>	19,5% (3,01)
<i>Gracilaria</i> sp.	Água T. ambiente	ni	ni
	Etanol a 80%	ni	26,1% (3,02)
	Acetona a 70%	ni	ni
Acarbose		0,264 mg/mL	-
Orliast		-	74,5 ng/mL

Resultados apresentados como média de 3 ensaios independentes. Letras iguais na mesma macroalga, na mesma coluna, indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Para o metabolismo lipídico foi utilizada a enzima lipase. Neste caso, quatro dos extratos testados, apresentaram valores mais baixos de inibição quando comparados com o medicamento orlistat (IC<sub>50</sub> = 74,5 ng/mL), enquanto os restantes não apresentaram inibição. O extrato de etanol a 80% da *Gracilaria* sp. resultou numa inibição de 26,1% a uma concentração de 3,02 mg/mL, enquanto os extratos de *F. vesiculosus* obtidos com acetona a 70%, água à temperatura ambiente e água quente revelaram-se capazes de inibir a atividade da lipase em 19,5, 25,0 e 15,2% com concentrações de 3,01, 3,05 e 2,99 mg/mL, respetivamente.

### 3.3 ANÁLISE NUTRICIONAL DOS EXTRATOS

Tendo em vista o objetivo principal deste trabalho, isto é, a utilização de extrato de macroalgas como ingrediente alimentar numa alheira vegetariana, tornou-se obviamente importante a análise nutricional dos potenciais extratos a aplicar. Mais concretamente, estes estudos foram efetuados com os extratos de água à temperatura ambiente, água quente e hidroetanólicos, não sendo considerados os extratos hidroacetónicos (devido à dificuldade legislativa na sua aplicação) e o extrato hidroetanólico da G, uma vez que este não demonstrou nenhum valor acrescentado em termos de capacidade antioxidante, em relação ao respetivo extrato aquoso.

### 3.3.1 Proteína

Pela análise da Figura 11, onde estão representados os valores de teor proteico, observa-se que o extrato de água à temperatura ambiente da G foi o que revelou maior quantidade de proteína ( $19\pm 0,1\%$ ), quando comparado com os extratos da F. No último caso, apresentaram valores não significativamente diferentes entre si numa gama de 6,6%-7,9% nos extratos de água quente, água à temperatura ambiente e etanol a 80%. Os resultados referentes à F. podem ser comparados aos descritos por Honold *et al.* (102). Neste estudo, os autores obtiveram valores proteicos de 7,2% e 1,7% para os extratos de água fria e etanol a 80%, respetivamente. No primeiro caso, o valor situou-se na mesma ordem de grandeza, enquanto o extrato de etanol a 80% apresentou um valor bastante inferior ao obtido neste estudo.

Estes resultados podem também ser comparados aos teores proteicos das macroalgas (Tabela 8). A G e a F apresentaram valores de  $29,5\pm 0,2\%$  e  $18,9\pm 0,3\%$ , respetivamente, o que revela que, o maior conteúdo de proteína no extrato de água da G, deveu-se ao facto da macroalga ser mais rica em proteína e as ficobiliproteínas serem solúveis em água.

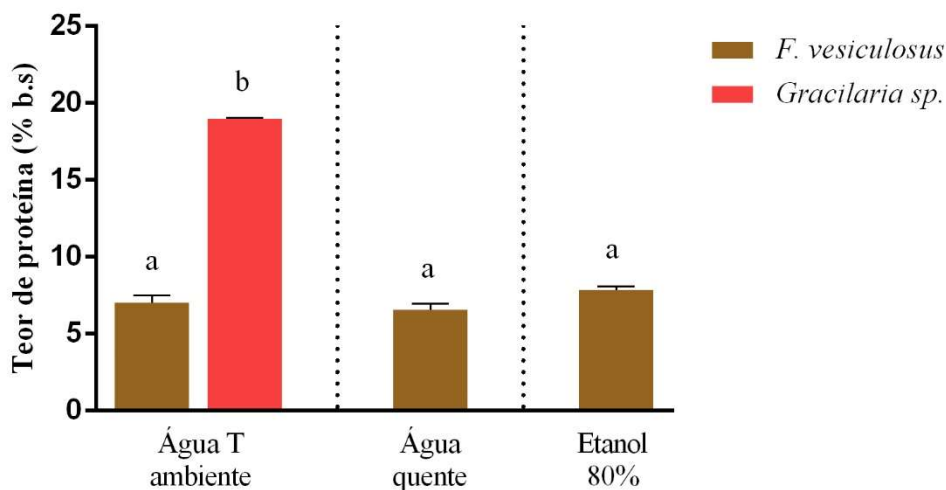


Figura 11 - Teor proteico expresso em percentagem, na base seca, obtido nos extratos da *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

### 3.3.2 Cinzas

Analisando o teor de cinzas dos extratos da F e G (Figura 12), verifica-se que o extrato de água à temperatura ambiente da G foi também o que apresentou o valor mais elevado de cinzas ( $55,9\pm 1,0\%$ ), aproximadamente 2 vezes superior ao encontrado nos extratos de água à temperatura ambiente ( $28,8\pm 0,3\%$ ), água quente ( $29,4\pm 0,4\%$ ) e etanol 80% ( $24,8\pm 0,4\%$ ) da F.

Estes resultados, quando comparados aos obtidos pelas macroalgas F ( $25,5\pm 0,2\%$ ) e G ( $28,9\pm 0,2\%$ ) (Tabela 8), verifica-se que, tal como ocorreu no teor proteico, o extrato de G foi o que exibiu maior teor, devendo este estar relacionado com o facto da macroalga apresentar o teor mais elevado.

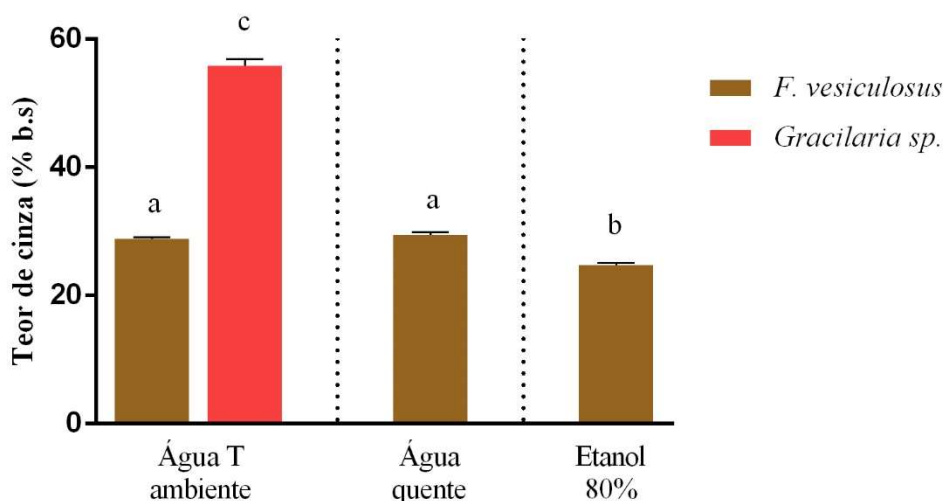


Figura 12 - Teor de cinzas, expresso em percentagem, na base seca, obtido nos extratos da *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3 Açúcares livres

Em relação ao teor de açúcares livres, os resultados obtidos (Figura 13) revelaram que o extrato de água quente da F foi o que originou o maior teor de açúcares totais, com um valor de  $13,8\pm 2,1\%$ , enquanto, os extratos de água à temperatura ambiente e etanol a 80% apresentaram valores mais baixos ( $7,5\pm 1,0\%$  e  $2,4\pm 0,5\%$ ), respetivamente. No caso da G, o

extrato de água à temperatura ambiente exibiu um teor de  $8,9\pm 1,5\%$ , não sendo este valor significativamente diferente quando comparado com o mesmo extrato da F.

Comparativamente a valores descritos na bibliografia, foi apenas possível encontrar dados referentes ao extrato de água à temperatura ambiente da F, descritos por Agregán *et al.* (103), em que o extrato aquoso foi preparado numa razão líquido/sólido de 30g/g durante 5 minutos, sendo posteriormente sonicado durante 10 minutos. Estes autores obtiveram um valor de açúcares livres de  $34,53\pm 2,9\%$ , sendo um valor muito superior ao obtido neste estudo.

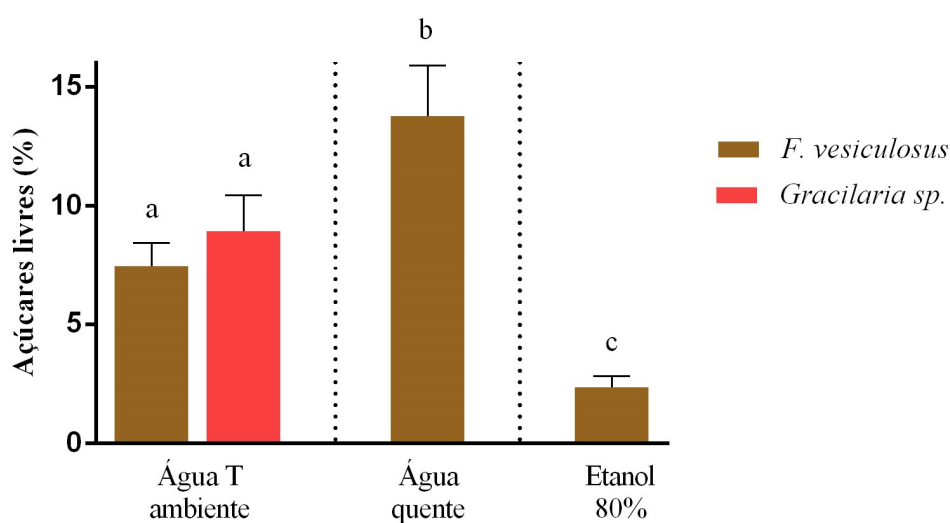


Figura 13 – Teor de açúcares livres, expresso em percentagem, na base seca, obtido nos extratos da *F. vesiculosus* e *Gracilaria sp.*. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.4 Fibra

Na Tabela 13 encontram-se os resultados do teor de fibra solúvel e insolúvel para os extratos da F e G. De acordo com o esperado, é possível verificar que o extrato de água quente da F foi o que revelou um maior teor ( $24,5\pm 4,0\%$ ) de fibra solúvel e o de etanol a 80% o menor ( $1,7\pm 0,7\%$ ), enquanto que, os de água à temperatura ambiente de ambas as macroalgas apresentaram valores numa gama de 14,9-17,2%, não sendo significativamente diferentes entre si. Em relação à fibra insolúvel, é possível observar valores inferiores a 0,5% nos extratos de água à temperatura ambiente de ambas as macroalgas e no de água quente da F, sendo o único valor mais relevante do extrato de etanol a 80% da F.

Analisando os teores de fibra das macroalgas F e G (Tabela 8), realça-se que esta última macroalga foi a que revelou um teor de fibra solúvel mais elevado (24,0%), enquanto a F possui um valor de 7,6%. Assim, comparando com os valores dos extratos, verifica-se que as fibras da F são mais solúveis em água do que as da G, e que, tal como expectável, a água (por oposição ao etanol a 80%) foi mais eficiente na extração da fibra solúvel em ambas as macroalgas.

Tabela 13 - Teor de fibra insolúvel e solúvel, expresso em percentagem, na base seca, obtido nos extratos da *F. vesiculosus* e *Gracilaria* sp.

Macroalga	<i>F. vesiculosus</i>			<i>Gracilaria</i> sp.
	Água T. ambiente	Água quente	Etanol a 80%	Água T. ambiente
<b>Fibra solúvel</b>	17,2 ± 0,7 <sup>a,c</sup>	24,5 ± 4,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	14,9 ± 0,8 <sup>c</sup>
<b>Fibra insolúvel</b>	≤ 0,5 <sup>a</sup>	≤ 0,5 <sup>a</sup>	6,9 ± 2,6 <sup>b</sup>	≤ 0,5 <sup>a</sup>

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha, indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS NA ALHEIRA VEGETARIANA

#### 3.4.1 Escolha do extrato a incorporar

Este trabalho contemplou ainda a incorporação de extratos num produto alimentar, mais especificamente numa alheira vegetariana. De entre os vários extratos anteriormente estudados, foram inicialmente selecionados os extratos aquosos das duas macroalgas para esta fase do trabalho, uma vez que esta etapa foi efetuada em ambiente empresarial, nomeadamente na empresa Irmãos Monteiro SA, no âmbito do projeto SHARP- “*Seaweed for Healthier Traditional Food Products*”, que inclui a utilização de extratos aquosos de F e G, como ingredientes alimentares em vários produtos, com vista a melhorar o seu valor nutricional e/ou bioativo.

Efetivamente, é de realçar que o extrato de água à temperatura ambiente da G é interessante sob o ponto de vista proteico e de cinzas (principalmente tendo em conta a razão Na/K desta macroalga ser cerca de 0,2), enquanto os da F revelaram-se interessantes em

termos de minerais e fibras, para além de algum eventual aporte na introdução de compostos antioxidantes.

Após a produção dos extratos, foi realizada uma análise sensorial (cheiro e sabor) em conjunto com os responsáveis de produção na empresa Irmãos Monteiro, S.A, onde se verificou que o extrato da G possuía um cheiro e sabor desagradável muito forte, sendo por isso eliminado nesta fase. É ainda importante salientar, que se tentou que o processo de incorporação dos extratos na alheira fosse bastante ágil e barato, incluindo a possibilidade de preparação de extrato diretamente na empresa e incorporação direta na formulação das alheiras, sem ter de proceder a qualquer evaporação/concentração do mesmo. Considerando os rendimentos obtidos nos extratos de água à temperatura ambiente, água quente e a quantidade máxima de água na formulação, a concentração de extrato possível de incorporar no produto foi de 0,4% (m/m peso húmido). Este valor foi considerado aceitável, tendo em consideração que na bibliografia a adição de extrato de *Laminaria digitata* em hambúrgueres foi realizada numa percentagem de 0,01; 0,1 e 0,5% (76), extrato aquoso de *Palmaria palmata* em presunto (0,11%) (75), e 0,25% e 0,5% de extrato de *Ascophyllum nodosum* e *F. vesiculosus* em iogurte (78).

Por outro lado, a percentagem de incorporação dos extratos de F a ser considerada neste estudo teve ainda em consideração as fortes características sensoriais dos extratos preparados, uma vez que não se pretendia alterar as propriedades organolépticas da alheira vegetariana devido à sua incorporação. O sabor do produto é um aspeto que condiciona muito as opções do consumidor e por isso, era importante que este fosse preservado ou que pelo menos, não fosse prejudicado.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ALHEIRA VEGETARIANA

#### 3.5.1 Análise da cor

O aspeto e a cor da superfície de um determinado alimento são um fator determinante avaliado pelo consumidor, para que este seja aceite em termos comerciais. Sendo a cor da superfície, um reflexo da primeira sensação que o consumidor tem para aceitar ou rejeitar o alimento (104). De facto, este é um parâmetro que não pode ser descurado mesmo se o alimento formulado for muito rico nutricionalmente. Se este possui uma cor diferente e menos atraente quando comparado com a formulação a que consumidores estão habituados,



pode causar impacto negativo na sua escolha. A observação da cor permite ainda detetar certos defeitos e anomalias que os alimentos possam apresentar.

Na Tabela 14 encontram-se os resultados da análise da cor, índice de acastanhamento e diferença total de cor ( $\Delta E$ ) efetuada às três amostras de alheira vegetariana. Os dados indicam que da leitura efetuada aos três parâmetros ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), o  $L^*$  foi o único onde se verificaram diferenças significativamente diferentes, indicando que a adição dos extratos da macroalga *F* causa uma diminuição da luminosidade da alheira, possivelmente devido ao facto de os extratos produzidos apresentarem uma cor castanha bastante escura. De facto, o índice de acastanhamento foi outro parâmetro a ser analisado, uma vez que funciona como indicador da extensão do acastanhamento em produtos alimentares contendo açúcar, onde ocorrem reações de acastanhamento enzimáticas ou não enzimáticas (90). Pela análise dos resultados é possível verificar que o índice aumentou nas alheiras com os extratos incorporados, alterando assim significativamente este parâmetro em relação ao controlo. Globalmente, a diferença total de cor ( $\Delta E$ ) das A\_ETA e A\_EQ face à A\_C foram significativas, com valores médios de  $3,68 \pm 0,5$  e  $3,95 \pm 0,1$ , respetivamente. É de notar que a lista padrão define que o  $\Delta E$  entre 0 e 1 o observador não percebe a diferença, entre 1 e 2, o observador experiente pode notar a diferença, entre 2 e 3,5, observadores experientes e inexperientes observam a diferença, enquanto valores entre 3,5 e 5 indicam claras diferenças na cor e, quando acima de 5, os observadores veem duas cores distintas (105). De acordo com isto, é possível concluir que seria possível observar a diferença entre a A\_C e A\_ETA, e A\_C e A\_EQ por observadores experientes e inexperientes.

Tabela 14 – Resultados da análise da cor à alheira controlo (A\_C), alheira com extrato de H<sub>2</sub>O à temperatura ambiente (A\_ETA) e H<sub>2</sub>O quente (A\_EQ) da *F. vesiculosus*

	A_C	A_ETA	A_EQ
<b>L*</b>	48,75±2,29 <sup>a</sup>	45,30±3,26 <sup>b</sup>	45,35±2,66 <sup>b</sup>
<b>a*</b>	10,46±1,02 <sup>a</sup>	10,48±1,15 <sup>a</sup>	9,65±1,47 <sup>a</sup>
<b>b*</b>	23,18±2,37 <sup>a</sup>	22,56±1,70 <sup>a</sup>	21,96±2,02 <sup>a</sup>
<b>Índice de acastanhamento</b>	74,74±5,70 <sup>a</sup>	84,86±5,08 <sup>b</sup>	81,51±5,09 <sup>b</sup>
<b><math>\Delta E</math></b>	-	3,68±0,5	3,95±0,1

Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais na mesma linha, indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

### 3.5.2 Análise química da alheira

Na Tabela 15 encontram-se os resultados obtidos na determinação do teor de humidade, cinzas, proteína, acidez e pH das diferentes amostras de alheira (controlo e com os extratos incorporados). Como se pode observar, o teor de humidade das três amostras de alheira, apresentaram valores muito semelhantes, não existindo por isso diferenças significativas entre si. Relativamente a valores descritos na literatura, não foi possível encontrar nenhuma informação para alheiras vegetarianas, contudo, um estudo efetuado por Campos *et al.* (106), reportou um teor de humidade de 56,4±1,64% para alheiras tradicionais, muito idêntico ao obtido neste estudo.

Tabela 15 - Valores obtidos na caracterização química da alheira controlo (A\_C), alheira com extrato de H<sub>2</sub>O à temperatura ambiente (A\_ETA) e H<sub>2</sub>O quente (A\_EQ) da *F. vesiculosus*

	A_C	A_ETA	A_EQ
<b>Humidade (%)</b>	55,51±0,19 <sup>a</sup>	55,39±0,61 <sup>a</sup>	56,92±0,00 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (% b.s)</b>	6,27±0,11 <sup>a</sup>	6,50±0,15 <sup>a</sup>	6,60±0,12 <sup>a</sup>
<b>Proteína (% b.s)</b>	24,76±1,42 <sup>a</sup>	22,13±0,70 <sup>a</sup>	22,82±1,43 <sup>a</sup>
<b>Acidez (% ácido láctico)</b>	13,8±1,27 <sup>a</sup>	14,9±1,06 <sup>a</sup>	12,9±0,42 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	6,49±0,16 <sup>a</sup>	6,55±0,09 <sup>a</sup>	6,36±0,22 <sup>a</sup>

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha, indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Em relação ao teor de cinzas verificou-se que as amostras com os extratos parecem ter uma tendência para o aumento, contudo, não são valores significativamente diferentes quando comparados ao controlo.

No respeitante ao teor proteico, de um modo geral a incorporação dos extratos não influenciou a percentagem de proteína nas amostras. No entanto, foi encontrado um teor de 24,8±1,4% para A\_C, enquanto a A\_ETA e A\_EQ possuíam 22,1±0,7% e 22,8±1,4%, respetivamente. Qualquer uma das amostras apresentou valores mais elevados de proteína quando comparadas com os valores encontrados por Patarata *et al.* (107) e Campos *et al.* (106) 10,12±2,3% e 13,0±0,5% em alheira tradicional, respetivamente.

Os parâmetros acidez e pH são fatores a considerar, pelo facto de os enchidos serem um produto fermentado, tendo por isso, inerente a presença de bactérias lácticas. O seu crescimento e desenvolvimento encontra-se associado à produção de ácido láctico, que é responsável pela alteração da acidez do enchido. Neste contexto, torna-se importante a determinação da acidez titulável nas amostras, com a finalidade de se obter uma referência na evolução destas bactérias. Note-se que, a diminuição do pH é importante para a não formação de bactérias indesejáveis no produto, este processo ocorre durante a maturação, onde o produto sofre uma fermentação conduzida pelas bactérias lácticas, conferindo assim um sabor mais ácido (108).

Analisando em maior detalhe os valores obtidos, é possível verificar que não houve diferenças significativas entre amostras. No caso da A\_C, esta apresentou uma percentagem de ácido láctico de  $13,8 \pm 1,3\%$ , enquanto a A\_ETA e A\_EQ revelaram valores de  $14,9 \pm 1,1\%$  e  $12,9 \pm 0,4\%$ , respetivamente. No que respeita aos valores de pH da A\_ETA (6,6) e A\_EQ (6,4) não se revelaram significativamente diferentes da A\_C (6,5). Comparativamente a valores descritos na literatura para a alheira tradicional, Patarata *et al.* (107) apresentaram um valor de 4,92, sendo este ligeiramente inferior aos alcançados neste estudo.

### **3.5.3 Teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estado de oxidação**

O teor de compostos fenólicos, a respetiva atividade antioxidante (ABTS<sup>•+</sup>) e o estado de oxidação (TBARS) da A\_C, A\_ETA e A\_EQ, encontram-se representados na Figura 14. Analisando os resultados obtidos para os compostos fenólicos (Figura 14-A), todas as amostras apresentaram valores inferiores a 0,04g EAG/100 g de alheira e sem diferenças significativas em entre si. Estes resultados, revelaram que independentemente do tipo de extrato incorporado, não foi possível aumentar o teor de compostos fenólicos, e que, possivelmente a percentagem de incorporação dos extratos, não foi suficiente para que se pudesse verificar alterações neste parâmetro.

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS<sup>•+</sup>, baseou-se na produção de ABTS<sup>•+</sup> que apresenta uma cor azul esverdeado e que, com a adição de um antioxidante, é reduzido a ABTS promovendo a perda de cor no meio reacional (109). Através da análise da Figura 14-B é possível concluir que não se registou diferenças significativas entre amostras. A A\_C, A\_ETA e de A\_EQ, apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de

815,4±21,3; 825,2±27,7 e 822,5±29,4 µg/mL, respectivamente, o que significa que a adição dos extratos não se revelou capaz de fornecer propriedades antioxidantes às alheiras.

A avaliação da peroxidação lipídica das alheiras foi realizada com base na determinação do teor de MDA, pelo método TBARS, uma vez que a quantidade deste composto é proporcional à oxidação. Assim, na figura 14-C encontram-se representados os valores obtidos, de onde é possível concluir que não existiu diferenças claras entre os níveis de MDA das diferentes amostras. A A\_C apresentou um valor de 3,35±0,4 mg MDA/kg alheira, enquanto a A\_ETA e A\_EQ da F exibiram valores de 4,1±0,14 e 4,05±0,07 mg MDA/kg alheira, respectivamente, revelando novamente que a incorporação de extratos à percentagem de 0,4% (m/m peso húmido), não foi o suficiente para produzir algum efeito protetor na oxidação das gorduras.

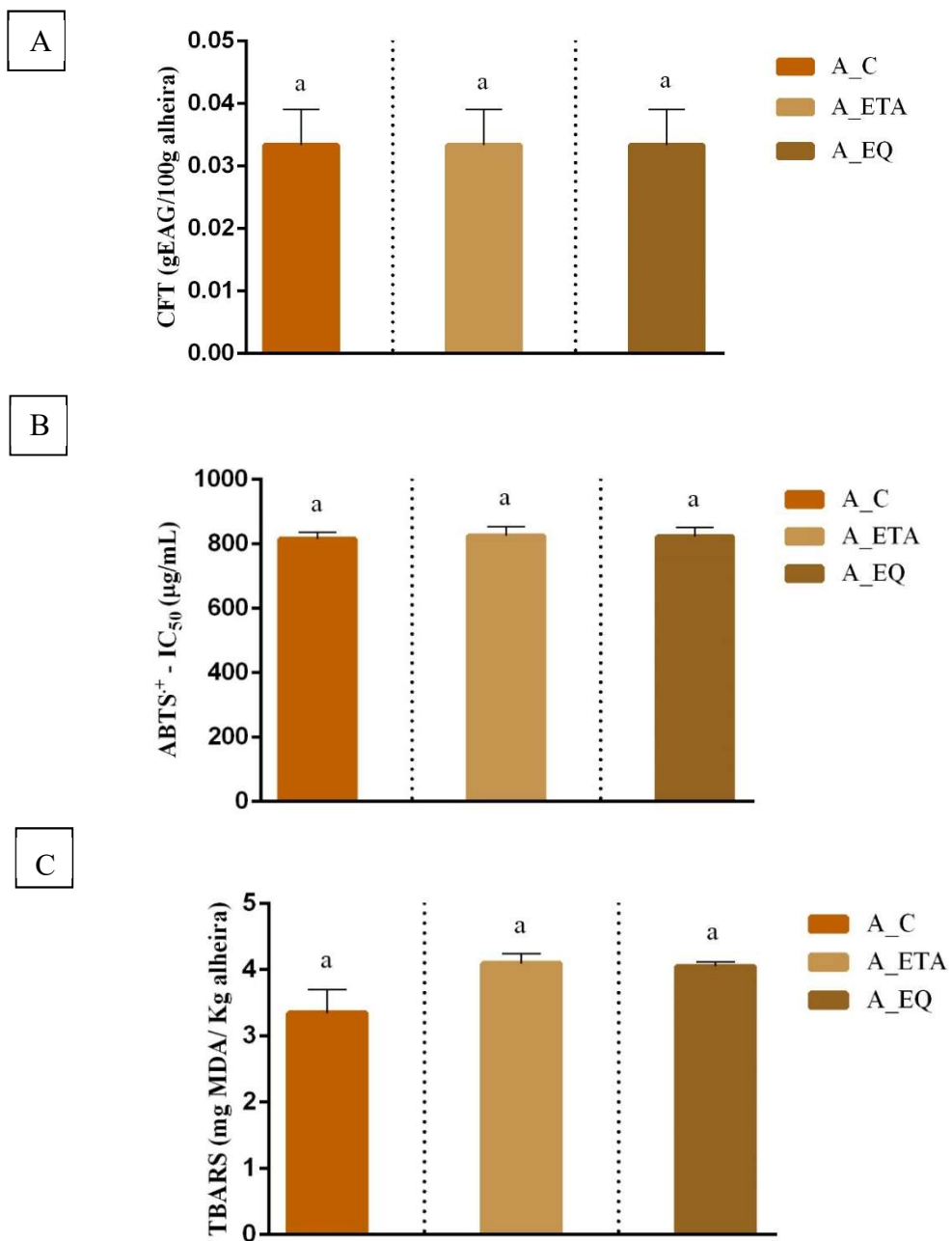


Figura 14 - Teor de compostos fenólicos totais (g EAG/100 g de alheira) (A), atividade antioxidante (ABTS<sup>+</sup>) (B) e estado de oxidação (TBARS) (C) expressos em IC<sub>50</sub> (µg/mL) e (mg MDA/kg alheira), respetivamente, obtidos a partir da alheira controlo (A\_C), alheira com extrato de H<sub>2</sub>O à temperatura ambiente (A\_ETA) e H<sub>2</sub>O quente (A\_EQ) da *F. vesiculosus*. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

### 3.5.4 Análise sensorial

Na figura 15 encontram-se representados os resultados da análise sensorial obtidos a partir de um painel de 29 provadores não treinados. Analisando em maior detalhe cada um dos parâmetros estudados, é possível verificar que no caso do sabor e cheiro, não existiu diferenças significativas quando comparado com o controlo, o que pode ser explicado pelo facto da formulação base ter um odor bastante forte, mascarando por isso o do extrato.

O parâmetro da cor, revelou que a incorporação dos diferentes extratos não teve qualquer influência, uma vez que não foram reportadas quaisquer diferenças significativas entre as amostras. Note-se que, estes resultados diferem dos obtidos pela leitura de cor superficial (secção 3.5.1), onde se registaram diferenças de  $\Delta E$ , sendo possível observar diferença entre a alheira com extrato e a alheira controlo. As diferenças encontradas entre estas duas análises, poderá estar relacionada com facto de terem sido utilizadas alheiras não confeccionadas, enquanto que na análise sensorial estavam confeccionadas.

Segundo a aceitação global, as amostras com os diferentes extratos e o controlo, não registaram diferenças significativas para que os provadores atribuíssem uma preferência entre as amostras. Apesar da alheira controlo revelar um valor ligeiramente superior, não foi suficiente para que fosse significativamente diferente das amostras com o extrato.

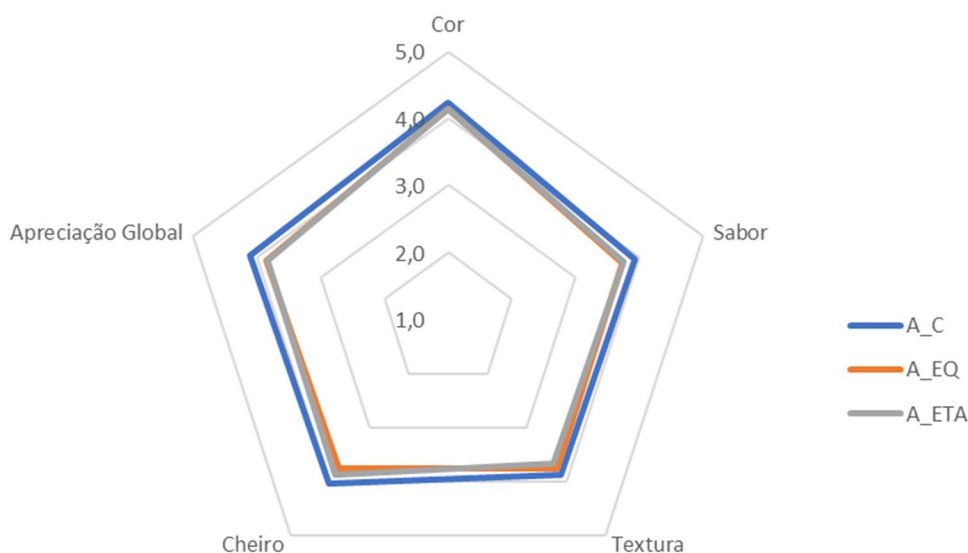


Figura 15 - Resultados da análise sensorial obtidos a partir dos extratos da alheira controlo (A\_C), extrato de H<sub>2</sub>O à temperatura ambiente (A\_ETA) e H<sub>2</sub>O quente (A\_EQ) da *F. vesiculosus*. Letras iguais indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo explorar a potencialidade de extratos das macroalgas F e G para a utilização em suplementos/alimentos funcionais que conferissem benefícios nutricionais e/ou físico-químicos ao produto selecionado (alheira vegetariana), uma vez que estas possuem componentes e exibem atividades que podem contribuir de forma benéfica para a saúde, incluindo os seus elevados conteúdos de fibra dietética, proteína, compostos fenólicos e a capacidade antioxidante.

Numa primeira fase, foi estudada a atividade biológica dos extratos das macroalgas, através da quantificação dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e inibição enzimática, permitindo perceber que os extratos da macroalga F foram aqueles que se revelaram mais promissores. No entanto, quando efetuadas as análises nutricionais, os extratos da macroalga G apresentaram teores mais elevados, nomeadamente de proteína e cinzas.

Na segunda fase do trabalho, testou-se a aplicação dos extratos de água à temperatura ambiente e água quente da macroalga F numa percentagem de 0,4% (m/m peso húmido) na alheira vegetariana, tendo-se avaliado os parâmetros físico-químicos e biológicos. Em termos nutricionais foi notório que as aplicações de ambos os extratos não corresponderam às expectativas, uma vez que não se verificou qualquer acréscimo significativo. De forma semelhante, os testes de atividade antioxidante indicaram que as incorporações dos extratos não tiveram qualquer influência significativa nos parâmetros testados, podendo concluir-se que as características originais da alheira não foram alteradas.

Em relação aos ensaios sensoriais, todas as amostras em estudo mantiveram os parâmetros de análise sem alterações significativas. Assim, e com base nos resultados de aceitação global da alheira vegetariana, os resultados indicaram que não existiram grandes alterações em relação ao produto original, e que, as diferenças registadas não foram suficientes para uma preferência entre amostras.

Em resumo, a incorporação dos extratos numa percentagem de 0,4% (m/m peso húmido) não se mostrou efetiva para que fossem notórias alterações dos parâmetros em estudo. Contudo, é de salientar que, apesar do cheiro intenso dos extratos foi possível obter alheiras sem valores sensoriais muito diferentes e bastante aceitáveis, sendo por isso, um indicador de que é possível aumentar a concentração de extrato. Considerando estes

resultados, fruto de uma primeira abordagem, futuramente seria interessante alterar algumas condições, nomeadamente a percentagem de extrato a incorporar, implementando um aumento significativo de forma a perceber qual a percentagem máxima aceite por parte dos consumidores. Outros aspetos a considerar, seria a determinação do teor de gordura, para que a análise da peroxidação lipídica fosse mais fidedigna, bem como a realização de ensaios microbiológicos às alheiras. Em termos de análise sensorial, seria interessante fazer a avaliação por painéis de provadores não treinados e treinados.



## 5. REFERÊNCIAS

1. WHO | Healthy diet [Internet]. WHO. [citado 12 de Dezembro de 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>
2. Seaweed-flavoured food and drink launches increased by 147% in Europe between 2011 and 2015 | Mintel.com [Internet]. [citado 8 de Outubro de 2017]. Disponível em: <http://www.mintel.com/press-centre/food-and-drink/seaweed-flavoured-food-and-drink-launches-increased-by-147-in-europe-between-2011-and-2015>
3. Buil-Cosiales P, Zazpe I, Toledo E, Corella D, Salas-Salvadó J, Diez-Espino J, et al. Fiber intake and all-cause mortality in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;100(6):1498–1507.
4. Baweja P, Kumar S, Sahoo D, Levine I. *Biology of Seaweeds*. Em: *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier; 2016. p. 41–106.
5. Lee R. *Phycology*. 4.<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.
6. Carvalho L, Pereira L. Review of Marine Algae as Source of Bioactive Metabolites: a Marine Biotechnology Approach. Em: *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology*. CRC Press; 2014. p. 195–227.
7. Dawes C. *Macroalgae Systematics*. Em: *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier; 2016. p. 107–148.
8. Pereira L. *Guia Ilustrado das Macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2009.
9. Pereira L. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. Em: *Seaweed: ecology, nutrient composition, and medicinal uses*. Hauppauge, N.Y: Nova Science; 2011. p. 248.
10. Philpott J, Bradford M. Seaweed: Nature’s Secret for a Long and Healthy Life? *The Nutrition Practitioner*. 2006;1–21.
11. Nehal N. Seaweed: A Potential «Superfood» Unexplored and Untapped. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*. 2014;5(6):631–42.
12. Holdt S, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*. 2011;23(3):543–97.
13. Murata M, Nakazoe J. Production and Use of Marine Algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 2001;35(4):281–90.
14. Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*. 2007;103(3):891–9.

15. Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K. Monthly determination of alginate, M/G ratio, mannitol, and minerals in cultivated *Laminaria japonica*. *Bulletin-Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1993;59(2):295–295.
16. Bobin-Dubigeon C, Lahaye M, Guillon F, Barry J, Fraternali D. Factors Limiting the Biodegradation of *Ulva* sp Cell-Wall Polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;75:341–51.
17. Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz F. Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research*. 2000;20(4):585–98.
18. Fleurence J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*. 1999;10(1):25–28.
19. Hernández-Carmona G, Carrillo-Domínguez S, Arvizu-Higuera DL, Rodríguez-Montesinos YE, Murillo-Álvarez J, Muñoz-Ochoa M, et al. Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J.E. Areschoug. *Journal of Applied Phycology*. 2009;21(5):607–16.
20. Ruperez P, Saura-Calixto F. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*. 2001;212(3):349–354.
21. Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz F. Characteristics and Nutritional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(2):236–58.
22. Wong K, Cheung P. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: Part I—proximate composition, amino acid profiles and some physicochemical properties. *Food Chemistry*. 2000;71(4):475–482.
23. Sánchez-Machado D, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*. 2004;85(3):439–44.
24. Kostetsky E, Goncharova S, Nina Sanina, Shnyrov V. Season influence on lipid composition of marine macrophytes. *Botanica Marina*. 2004;47:134–9.
25. Mišurcová L, Ambrožová J, Samek D. Seaweed Lipids as Nutraceuticals. Em: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier; 2011. p. 339–55.
26. Bjerregaard P, Young T, Hegele R. Low incidence of cardiovascular disease among the Inuit—what is the evidence? *Atherosclerosis*. 2003;166(2):351–357.
27. Candela C, López L, Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria*. 2011;26(2):323–329.

28. Dembitsky V, Pechenkina-Shubina E, Rozentsvet O. Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. *Phytochemistry*. 1991;30(7):2279–83.
29. Ito K, Hori K. Seaweed: Chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International*. Janeiro de 1989;5(1):101–44.
30. Fleurence S. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 1993;4:103–7.
31. Flores S, Dobbs J, Dunn M. Mineral nutrient content and iron bioavailability in common and Hawaiian seaweeds assessed by an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;43:185–93.
32. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 19(2):164–74.
33. Andrew P, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. 1999;43(3):521–531.
34. MacArtain P, Gill C, Brooks M, Campbell R, Rowland I. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*. 2007;65(12):535–43.
35. Rupérez P. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*. 2002;79(1):23–26.
36. Ferraces-Casais P, Lage-Yusty M, Quirós A, López-Hernández J. Evaluation of Bioactive Compounds in Fresh Edible Seaweeds. *Food Analytical Methods*. 2012;5(4):828–34.
37. Kolb N, Vallorani L, Milanovic N, Stocchi V. Evaluation of marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and kombu (*Laminaria digitata japonica*) as food supplements. *Food Technology and Biotechnology*. 2004;42(1):57–62.
38. Hamid N, Ma Q, Boulom S, Liu T, Zheng Z, Balbas J, et al. Seaweed minor constituents. Em: *Seaweed Sustainability*. Elsevier; 2015. p. 193–242.
39. Watanabe F, Takenaka S, Katsura H, Masumder S, Abe K, Tamura Y, et al. Dried Green and Purple Lavers (Nori) Contain Substantial Amounts of Biologically Active Vitamin B<sub>12</sub> but Less of Dietary Iodine Relative to Other Edible Seaweeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(6):2341–3.
40. Peng Y, Hu J, Yang B, Lin X-P, Zhou X-F, Yang X-W, et al. Chemical composition of seaweeds. Em: *Seaweed Sustainability*. Elsevier; 2015. p. 79–124.
41. Balboa E, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*. 2013;138(2–3):1764–85.

42. Miyashita K. The carotenoid fucoxanthin from brown seaweed affects obesity. *Lipid Technology*. 2009;21(8–9):186–90.
43. Gerasimenko N, Logvinov S. Seasonal Composition of Lipids, Fatty Acids Pigments in the Brown Alga *Sargassum pallidum*: The Potential for Health. *Open Journal of Marine Science*. 2016;6(4):498–523.
44. Fung A, Hamid N, Lu J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry*. 2013;136(2):1055–62.
45. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;332(2):392–7.
46. Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*. 2008;20(2):113–36.
47. Marinho-Soriano E. Effect of depth on growth and pigment contents of the macroalgae *Gracilaria bursa-pastoris*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2012;22(4):730–735.
48. Romay C, Gonzalez R, Ledon N, Ramirez D, Rimbau V. C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current protein and peptide science*. 2003;4(3):207–216.
49. Amsler C, Fairhead V. Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Em: Advances in Botanical Research*. Elsevier; 2005. p. 1–91.
50. Li Y-X, Wijesekara I, Li Y, Kim S-K. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*. 2011;46(12):2219–24.
51. Liu H, Gu L. Phlorotannins from Brown Algae (*Fucus vesiculosus*) Inhibited the Formation of Advanced Glycation Endproducts by Scavenging Reactive Carbonyls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(5):1326–34.
52. Wang T, Jónsdóttir R, Liu H, Gu L, Kristinsson H, Raghavan S, et al. Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(23):5874–83.
53. Cumashi A, Ushakova N, Preobrazhenskaya M, D’Incecco A, Piccoli A, Totani L, et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*. 2006;17(5):541–52.
54. Sandsdalen E, Haug T, Stensvag K, Styrvold O. The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2003;19:777–82.

55. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7.<sup>a</sup> ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.
56. Risk factors [Internet]. World Heart Federation. [citado 9 de Outubro de 2017]. Disponível em: <https://www.world-heart-federation.org/resources/risk-factors/>
57. Kumar S, Brown L. Seaweeds as potential therapeutic interventions for the metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2013;14(3):299–308.
58. Nwosu F, Morris J, Lund V, Stewart D, Ross H, McDougall G. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*. 2011;126(3):1006–12.
59. Apostolidis E, Lee C. In Vitro Potential of *Ascophyllum nodosum* Phenolic Antioxidant-Mediated  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibition. *Journal of Food Science*. 2010;75(3):H97–102.
60. Hwang P-A, Hung Y-L, Tsai Y-K, Chien S-Y, Kong Z-L. The brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* exhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and enhances insulin release in vitro. *Cytotechnology*. 2015;67(4):653–60.
61. Wan-Loy C, Siew-Moi P. Marine Algae as a Potential Source for Anti-Obesity Agents. *Marine Drugs*. 2016;14(12):222.
62. Eom S-H, Lee M-S, Lee E-W, Kim Y-M, Kim T. Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of Phlorotannins Isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytotherapy Research*. 2013;27(1):148–51.
63. Wilcox M, Brownlee I, Richardson J, Dettmar P, Pearson J. The modulation of pancreatic lipase activity by alginates. *Food Chemistry*. 2014;146:479–84.
64. Menrad K. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of food engineering*. 2003;56(2):181–188.
65. Diplock A, Aggett P, Ashwell M, Bornet F, Fern E, Robertfroid M. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition*. 1993;81:S1–27.
66. Jiménez-Colmenero F, Cofrades S, López-López I, Ruiz-Capillas C, Pintado T, Solas M. Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Science*. 2010;84(3):356–63.
67. Choi Y-S, Kum J-S, Jeon K-H, Park J-D, Choi H-W, Hwang K-E, et al. Effects of Edible Seaweed on Physicochemical and Sensory Characteristics of Reduced-salt Frankfurters. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2015;35(6):748–56.
68. Cox S, Abu-Ghannam N. Enhancement of the phytochemical and fibre content of beef patties with *Himanthalia elongata* seaweed. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013;2239–49.

69. Senthil A, Mamatha B, Mahadevaswamy M. Effect of using seaweed (eucheuma) powder on the quality of fish cutlet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2005;56(5):327–35.
70. Chang H, Wu L-C. Texture and Quality Properties of Chinese Fresh Egg Noodles Formulated with Green Seaweed (*Monostroma nitidum*) Powder. *Journal of Food Science*. 2008;73(8):S398–404.
71. Chang H-C, Chen H-H, Hu H-H. Textural changes in fresh egg noodles formulated with seaweed powder and full or partial replacement of cuttle fish past: textural changes in fresh egg noodles. *Journal of Texture Studies*. 2011;42(1):61–71.
72. Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N, Hirose A, Stephen N, Gowda L, et al. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*. 2009;115(2):501–8.
73. Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N. Influence of Indian Brown Seaweed (*Sargassum marginatum*) as an Ingredient on Quality, Biofunctional, and Microstructure Characteristics of Pasta. *Food Science and Technology International*. 2009;15(5):471–9.
74. Mamat H, Matanjun P, Ibrahim S, Amin S, Abdul Hamid M, Rameli A. The effect of seaweed composite flour on the textural properties of dough and bread. *Journal of Applied Phycology*. 2014;26(2):1057–62.
75. Barbieri G, Barbieri G, Bergamaschi M, Francheschini M, Berizi E. Reduction of NaCl in cooked ham by modification of the cooking process and addition of seaweed extract (*Palmaria palmata*). *LWT - Food Science and Technology*. 2016;73:700–6.
76. Moroney N, O’Grady M, O’Doherty J, Kerry J. Effect of a brown seaweed (*Laminaria digitata*) extract containing laminarin and fucoidan on the quality and shelf-life of fresh and cooked minced pork patties. *Meat Science*. 2013;94(3):304–11.
77. Ortiz J, Vivanco J, Aubourg S. Lipid and sensory quality of canned Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect of the use of different seaweed extracts as covering liquids: Seaweed extracts on canned salmon quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014;116(5):596–605.
78. O’Sullivan A, O’Callaghan Y, O’Grady M, Waldron D, Smyth T, O’Brien N, et al. An examination of the potential of seaweed extracts as functional ingredients in milk. *International Journal of Dairy Technology*. 2014;67(2):182–93.
79. Coyer J, Hoarau G, Oudot-Le M-P, Stam W, Olsen J. A mtDNA-based phylogeny of the brown algal genus *Fucus* (Heterokontophyta; Phaeophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006;39(1):209–22.
80. Díaz-Rubio ME, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009;60(sup2):23–34.

81. Ferreira V, Barbosa J, Silva J, Felício M, Mena C, Hogg T, et al. Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control*. 2007;18(5):436–40.
82. Guerrero L, Guàrdia M, Xicola J, Verbeke W, Vanhonacker F, Zakowska-Biemans S, et al. Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*. 2009;52(2):345–54.
83. Vandendriessche F. Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*. 2008;78(1–2):104–13.
84. Ospina-E J, Cruz-S A, Pérez-Álvarez J, Fernández-López J. Development of combinations of chemically modified vegetable oils as pork backfat substitutes in sausages formulation. *Meat Science*. 2010;84(3):491–7.
85. I'm Natura [Internet]. [citado 12 de Outubro de 2017]. Disponível em: <http://www.imnatura.com>
86. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 1965;16(3):144–158.
87. Wickramaratne MN, Punchihewa JC, Wickramaratne DBM. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenantha pavonina*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16(1).
88. Sarkar D, Orwat J, Hurburt T, Woods F, Pitts J, Shetty K. Evaluation of phenolic bioactive-linked functionality of blackberry cultivars targeting dietary management of early stages type-2 diabetes using in vitro models. *Scientia Horticulturae*. 2016;212:193–202.
89. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Annals of clinical biochemistry*. 2001;38(4):365–370.
90. Augusto A, Simões T, Pedrosa R, Silva S. Evaluation of seaweed extracts functionality as post-harvest treatment for minimally processed Fuji apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2016;33:589–95.
91. Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 2009;116(1):240–8.
92. Koivikko R, Lopenen J, Honkanen T, Jormalainen V. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*. 2005;31(1):195–212.

93. Jormalainen V, Honkanen T. Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Evolutionary Biology*. 2004;17(4):807–20.
94. Keyrouz R, Abasq M, Bourvellec C, Blanc N, Audibert L, ArGall E, et al. Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry*. 2011;126(3):831–6.
95. Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001;81:530–4.
96. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70–76.
97. O’Sullivan A, O’Callaghan Y, O’Grady M, Queguineur B, Hanniffy D, Troy D, et al. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chemistry*. 2011;126(3):1064–70.
98. Huang H-L, Wang B-G. Antioxidant Capacity and Lipophilic Content of Seaweeds Collected from the Qingdao Coastline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(16):4993–7.
99. Commission Directive 2010/67/EU of 20 October 2010 amending Directive 2008/84/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners.
100. Gabbia D, Dall’Acqua S, Gangi I, Bogialli S, Caputi V, Albertoni L, et al. The Phytocomplex from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum* Controls Postprandial Plasma Glucose Levels: An In Vitro and In Vivo Study in a Mouse Model of NASH. *Marine Drugs*. 2017;15(2):41.
101. Roy M-C, Anguenot R, Fillion C, Beaulieu M, Bérubé J, Richard D. Effect of a commercially-available algal phlorotannins extract on digestive enzymes and carbohydrate absorption in vivo. *Food Research International*. 2011;44(9):3026–9.
102. Honold P, Jacobsen C, Jónsdóttir R, Kristinsson H, Hermund D. Potential seaweed-based food ingredients to inhibit lipid oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise. *European Food Research and Technology*. 2016;242(4):571–84.
103. Agregán R, Munekata P, Domínguez R, Carballo J, Franco D, Lorenzo J. Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Research International*. 2017;99:986–94.
104. León K, Mery D, Pedreschi F, León J. Color measurement in L\* a\* b\* units from RGB digital images. *Food Research International*. 2006;39(10):1084–91.



105. Mokrzycki W, Tatol M. Colour difference  $\Delta E$  - A survey. *Machine Graphic & Vision*. 2012;383–411.
106. Campos S, Alves R, Mendes E, Costa A, Casal S, Oliveira M. Nutritional value and influence of the thermal processing on a traditional Portuguese fermented sausage (alheira). *Meat Science*. 2013;93(4):914–8.
107. Patarata L, Judas I, Silva J, Esteves A, Martins C. A comparison of the physicochemical and sensory characteristics of alheira samples from different-sized producers. *Meat Science*. 2008;79(1):131–8.
108. Ho V, Zhao J, Fleet G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;543–597.
109. Sucupira N, da Silva A, Pereira G, da Costa J. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *Journal of Health Sciences*. 2012;14(4):263–9.