



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Ana Catarina da Graça Correia

Desenvolvimento de produto: Aplicações alimentares e valor nutricional da microalga *Chlorella vulgaris*

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em
Empreendedorismo e Inovação na Indústria Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Manuela Vaz Velho

e co-orientação da
Professora Eng. Carla Barbosa

Novembro de 2014

JÚRI

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho, não seria possível sem a preciosa ajuda de várias pessoas. Quero deixar os meus agradecimentos a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do mesmo.

Aos meus pais, o meu especial agradecimento pelo amor e apoio incondicional, pelas palavras sábias transmitidas e por todos os caminhos que me abriram. Um agradecimento especial aos meus irmãos por estarem sempre presentes.

À Frulact, pelo acolhimento e pela possibilidade de integrar um projeto inovador e irreverente. Um agradecimento especial ao departamento de Inovação à Eng^a Pilar Morais e à Eng^a Helena Gomes pela orientação em todo o trabalho. A todos os colegas do laboratório de Desenvolvimento e Aplicações em especial Bernardete Martins, Cláudia Lopes, Maria João e Celestino Oliveira obrigada pela ajuda e por todas as dicas importantes.

À Professora Doutora Manuela Vaz Velho pela sua orientação, pela disponibilidade demonstrada, pela paciência e pelo entusiasmo que empenhou neste projeto desde o início.

À Professora Engenheira Carla Barbosa pela sua coorientação, pela disponibilidade e pela preciosa ajuda com os números e a estatística.

Ao Nelson Fernandes, pela paciência, pelas palavras de incentivo e apoio incondicional. Obrigada pela tua presença discreta, mas fundamental.

À minha amiga e companheira de todas as horas, Débora por todas as conversas, motivação e pelo espírito de entreaajuda que nos acompanhará sempre.

A todos o meu OBRIGADA!

A elaboração da dissertação conduziu à realização dos seguintes trabalhos:

Comunicações em congressos:

- **Correia, A.C.**, Morais, P., Gomes, M.H., Barbosa, C., Vaz Velho, M. 2014. Estudo do efeito do pH e da pasteurização na cor de soluções tamponadas com *Chlorella vulgaris*. **Comunicação oral/poster** apresentada no Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura - VII FIRMA Machala, Equador, 18-21 de novembro. (Apêndice IX)

- **A. Catarina Correia**; Pilar Morais; M. Helena Gomes; Carla Barbosa; Rita Pinheiro, Manuela Vaz Velho (2014) Study of the effect of pH on colour of flavoured solutions of *Spirulina* spp.. **Comunicação em painel** no congresso FoodInnova 2014, Concordia, Argentina, 20-23 de outubro 2014. Poster nº 412, pág. 237. ISBN: 978-950-698-340-6. (Apêndice IX)

- **Correia, A.C.**, Morais, P., Gomes, M.H.², Barbosa, C., Vaz Velho, M. (2014) Study of the effect of pH on colour of flavoured solutions of *Spirulina* spp. and *Chlorella vulgaris*. **Comunicação em painel** no congresso: 8th Eurofoodwater Conference. Timisoara, Roménia, 25-27 de maio 2014. (Apêndice IX)

Imprensa internacional:

- “*Protein rich super smoothies with microalgae: Allma's high hopes for chlorella*” em BeverageDaily.com, <http://www.beveragedaily.com/Ingredients/Super-smoothies-with-microalgae-Allma-s-high-hopes-for-chlorella>

- “*Allma partners with Frulact and Santini for Chlorella bubble tea and sorbet*” em FoodBev.com, http://www.foodbev.com/news/allma-partners-with-frulact-and-santini#.U-TO0_idVK8

Imprensa internacional (continuação):

- *“The uses of Chlorella powder”* em Confectionery Production, <http://www.confectioneryproduction.com/11509/news/the-uses-of-chlorella-powder/>

- *“Allma’s Chlorella Makes its Debut – In Bubble Tea and Sorbet”* em Food Ingredients, <http://www.foodingredientsfirst.com/news/Allmas-Chlorella-Makes-its-Debut-In-Bubble-Tea-and-Sorbet.html>

- *“Allma enters the microalgae market with premium sun-grown Chlorella”* em Nutraceutical Business Review, http://www.nutraceuticalbusinessreview.com/news/article_page/Allma_enters_the_microalgae_market_with_premium_sungrown_Chlorella/98627/cn6704?dm_t=0%2c0%2c0%2c0%2c0&sthash.FwyRthvR.mjjo

- *“Portuguese player enters chlorella space”* em NUTRAingredients.com, <http://www.nutraingredients.com/Industry/Portuguese-player-enters-chlorella-space>

RESUMO

As microalgas representam uma fonte alternativa e renovável com enorme potencial para obtenção de nutrientes importantes para a dieta humana (carotenóides e polifenóis). A microalga *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) é amplamente estudada para consumo humano, não só por causa das suas propriedades antioxidantes, mas também por ser rica em proteínas. Também a *Spirulina* spp. que foi reclassificada como cianobactéria e renomeada de *Arthrospira* spp, tem sido amplamente estudada como um ingrediente

O principal objetivo deste trabalho foi explorar as potencialidades da microalga *Chlorella vulgaris* para aplicação na indústria alimentar. Para tal, o trabalho foi dividido em duas partes sendo que numa primeira fase pretendeu-se estudar o comportamento da microalga face a diferentes fatores, nomeadamente o pH, a temperatura e a concentração do produto. Por outro lado, pretendia-se também com este trabalho incorporar este ingrediente em matrizes alimentares diversas de modo a obter produtos viáveis não só tecnologicamente, mas também apelativos e com potencial para lançamento no mercado.

Foram realizados 5 ensaios nos quais se estudaram o efeito do pH, da temperatura e da concentração na cor de soluções com *Chlorella vulgaris*. Nestes ensaios a microalga foi testada em separado, com adição de *Spirulina* spp. e também num preparado complexo. Verificou-se que a valores de pH mais ácidos desencadeia-se a conversão da clorofila (cor verde) num subproduto de cor castanha. Esta degradação/conversão é mais acentuada quando o tratamento térmico é mais severo. Assim concluiu-se que a aplicação da microalga poderá ter potencial somente em produtos cujo pH se aproxima da neutralidade e cujos tratamentos térmicos que o originam não sejam demasiado agressivos. Relativamente à aplicação da microalga em matrizes alimentares diversas, os resultados revelam que os produtos testados se mantêm relativamente estáveis durante o tempo de prateleira considerado, pois a maioria dos parâmetros considerados comportaram-se de forma constante ao longo do tempo. Tal como concluído anteriormente nas matrizes cujo pH é mais baixo ocorre degradação do pigmento. Do ponto de vista sensorial e de acordo com os provadores a microalga será melhor evidenciada quando aplicada em bases salgadas e no caso de matrizes doces a sua aplicação poderá ser realizada, mas em percentagens inferiores relativamente às anteriores.

Novembro de 2014

ABSTRACT

Microalgae have been identified as an alternative and innovative source of nutrients considered important to human diet in particular as a source of natural antioxidants not only carotenoids but also polyphenols. The microalgae *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) have been also widely studied for human consumption purposes not only because of its antioxidant properties but also as a protein-rich ‘‘health’’ food. *Spirulina* spp., which has been reclassified as a Cyanobacteria and renamed *Arthrospira* spp., has also been widely studied as a food ingredient or supplement.

The main objective of this study was to ascertain the potential of microalgae *Chlorella vulgaris* for the development of new food products. For that purpose, the experimental section of the present work was divided in two parts. In the first part the study of the behaviour of *Chlorella vulgaris* with respect to different factors, such as pH, temperature and concentration of the microalgae, was performed. In the second part, the incorporation of the microalgae in various food matrices, in order to obtain viable products, not only technologically but also appealing, was evaluated.

In the first part five assays under three conditions were tested: *Chlorella vulgaris* alone, together with *Spirulina* spp. and also in complex food matrices. It has been found that the more acidic pH values triggers the conversion of chlorophyll (green colour) into a brown by-product. This degradation/conversion is more pronounced when the heat treatment is more severe. Thus it was concluded that the application of microalgae may have potential for products whose pH approaches neutrality and whose thermal treatments are not too aggressive.

In the second part- the application of microalgae in various food matrices, the results show that the tested products remained relatively stable for the intended shelf life, and most of the parameters considered behaved consistently over time, however in matrices of lower pH also occurred degradation of the pigment.

From a sensory point of view it was considered that the microalgae will be better evidenced and have greater potential when applied in salt matrices and, in the case of sweet matrices, its incorporation can be also considered but in lower concentrations.

ÍNDICE GERAL

Júri.....	II
Agradecimentos.....	III
Resumo.....	VI
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas.....	XIV
Lista de Abreviaturas.....	XIX
1. Introdução.....	1
1.1 Contextualização do tema.....	1
1.2 Objetivos	2
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Microalgas	3
2.2 <i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck, 1890 – Características gerais	9
2.2.1 <i>Chlorella vulgaris</i> (Beijerinck, 1890) - Perfil nutricional.....	10
2.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i> (Beijerinck, 1890) – Fonte de clorofila.....	11
2.2.3 <i>Chlorella vulgaris</i> (Beijerinck, 1890) como alimento	12
2.3 <i>Spirulina</i> spp. (<i>Arthrospira</i>).....	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Métodos analíticos.....	15
3.1.1 <i>Medição de Cor</i>	15
3.1.2 <i>Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)</i>	17
3.1.3 <i>Determinação do pH</i>	17
3.1.4 <i>Determinação da viscosidade</i>	18
3.1.5 <i>Análises microbiológicas</i>	18
3.1.6 <i>Análise Sensorial</i>	20

3.1.7	<i>Análise Estatística e tratamento de dados</i>	23
3.2	Procedimento experimental	23
3.2.1	Caracterização da matéria-prima principal (<i>Chlorella vulgaris</i> , em pó).....	23
3.2.2	Efeito da temperatura e concentração na cor de soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> 24	
3.2.3	Efeito do pH na cor de soluções com <i>Chlorella vulgaris</i>	26
3.2.4	Efeito do processamento térmico na carga microbiológica – definição de binômios tempo/temperatura de processamento.....	30
3.2.5	Aplicação da <i>Chlorella vulgaris</i> em matrizes alimentares.....	32
4.	Resultados e Discussão	41
4.1	Efeito da temperatura e concentração na cor de soluções com <i>Chlorella vulgaris</i> ..	41
4.2	Efeito do pH na cor de soluções com <i>Chlorella vulgaris</i>	46
4.3	Efeito do processamento térmico na carga microbiológica.....	58
4.4	Aplicação da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em matrizes alimentares.....	- 60 -
5.	Conclusões Gerais	76
6.	Referências Bibliográficas	77
	Cibergrafia.....	79
	APÊNDICES.....	80
	Apêndice I – Equipamento utilizados para as análises físico-químicas	81
	Apêndice II - Efeito da temperatura e concentração na cor de soluções com <i>Chlorella vulgaris</i>	82
	Apêndice III – Efeito do pH na cor de soluções com <i>Chlorella vulgaris</i> (Soluções tampão).....	84
	Apêndice IV – Efeito pH na cor (soluções acidificadas de <i>Spirulina</i> ; Soluções <i>Spirulina/Chlorella</i> ; Preparado <i>Chlorella vulgaris</i>).....	90
	Apêndice VI – Aplicação da microalga em matrizes alimentares – <i>Frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i>	98
	Apêndice VII – Aplicação da microalga em matrizes alimentares – <i>Power bubble</i> e “preparado mediterrânico”	103

Apêndice VIII – Aplicação da microalga em matrizes alimentares – Lista de matérias-primas e respectivos fornecedores	106
Apêndice IX – Comunicações realizadas em congressos (posters).....	107
Apêndice X – Exemplos de produtos desenvolvidos ao longo do projeto	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de microalgas produzidas à escala industrial. Da esquerda para a direita: <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Dunaliella Salina</i>	5
Figura 2 - Sistemas de produção de microalgas. Produção em fotobioreatores nas instalações da “Allma” (à esquerda) e produção em tanques abertos (à direita).....	6
Figura 3 - Uso microalgas em diversos tipos de indústrias	8
Figura 4 - <i>Chlorella vulgaris</i> sob a forma seca (à esquerda) células <i>Chlorella vulgaris</i> (à direita) ..	9
Figura 5 - Análise de mercado de produtos com <i>Chlorella vulgaris</i> (país e categoria).....	13
Figura 6 - Produtos alimentares que se encontram atualmente à venda no mercado cuja composição contém a microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	13
Figura 7 - Representações dos parâmetros de cor (à esquerda o espaço de cor em três dimensões), à direita representação do ângulo <i>hue</i>	16
Figura 8 - Representação esquemática dos dois tipos de análise sensorial elaborados	21
Figura 9 - Ficha de prova fornecida para resultados teste de aceitabilidade	22
Figura 10 - Esquema tratamentos térmicos aplicados às soluções com 1% de <i>Chlorella vulgaris</i> ..	31
Figura 11 - Fluxograma de produção de <i>frushapes</i> de banana e <i>Chlorella vulgaris</i> à esquerda e formas de corte à direita	33
Figura 12 - Análise componentes principais (dia 0 à esquerda, dia 2 ao centro e dia 5 à direita) ...	41
Figura 13 - Influência da cor na pasteurização (soluções açucaradas à esquerda, à direita soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> sem açúcar).	43
Figura 14 - Análise de componentes principais para as soluções tampão de citrato-fosfato com <i>Chlorella vulgaris</i>	46
Figura 15 - Soluções tampão de citrato-fosfato com <i>Chlorella vulgaris</i> após pasteurização.	48
Figura 16 - Soluções de <i>Spirulina</i> spp. a diferentes valores de pH antes e após pasteurização (à esquerda antes da pasteurização e à direita após pasteurização).....	50
Figura 17 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° das soluções de <i>Spirulina</i> spp.	50
Figura 18 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° das soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	53

Figura 19 - Soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp. a diferentes valores de pH (à esquerda antes da pasteurização, à direita após pasteurização).....	55
Figura 20 - Análise de componentes principais que representa a variação de cor do “Preparado” com <i>Chlorella vulgaris</i>	56
Figura 21 – Amostras do “preparado” com <i>Chlorella vulgaris</i> (amostras à esquerda antes pasteurização, amostras à direita após pasteurização).....	57
Figura 22 - Valores de pH obtidos em cada versão de <i>smoothie</i>	62 -
Figura 23 - Fenómeno de deposição nas formulações de <i>smoothies</i> (à esquerda), aspeto <i>smoothie</i> após pasteurização (à direita)	63 -
Figura 24 - Análise de componentes principais para as variações de cor de <i>frushapes</i> com <i>Chlorella vulgaris</i> (à esquerda), <i>frushapes</i> na sua forma seca (à direita).....	64
Figura 25 - Análise de componentes principais para as variações de cor do preparado com <i>frushapes</i> (à esquerda), <i>frushapes</i> aplicados em preparado (à direita).....	66
Figura 26 - Evolução dos parâmetros físico-químicos do preparado com aplicação de <i>frushapes</i> de <i>Chlorella vulgaris</i> (em cima à esquerda: pH, em cima à direita: °Brix, em baixo: viscosidade	67
Figura 27 - Preparado salgado (à esquerda) preparado salgado aplicado em queijo “ <i>Philadelphia</i> ” (à direita)	69
Figura 28 - Variações dos parâmetros de pH e °Brix do preparado salgado com <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo de 35 dias de amostragem.....	69
Figura 29 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo do tempo.....	70
Figura 30 - Variações dos parâmetros de pH e °rix do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo do tempo	71
Figura 31 - Resultados testes de aceitabilidade realizados aos consumidores do “Preparado mediterrânico”. Caracterização do produto (à esquerda), opção de compra (à direita)	72
Figura 32 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° das <i>Power Bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo de 21 dias de amostragem.....	73
Figura 33 - Variações dos parâmetros de pH e °Brix das <i>Power Bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo de 21 dias de amostragem	74
Figura 34 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° da calda de conservação das <i>Power Bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo de 21 dias de amostragem	74

Figura 35 - Variações de pH e °Brix da calda de conservação das <i>Power Bubble</i> para 21 dias de amostragem	75
Figura 36 - Testes de aceitabilidade. Caracterização do produto (esq.), opção de compra (dir.).....	75
Figura 37 - Equipamentos utilizados para medição dos parâmetros: Refratômetro, Potenciômetro, Colorímetro portátil e viscosímetro de Bostwick.....	81
Figura 38 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com <i>Chlorella vulgaris</i> - parâmetro L*	86
Figura 39 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com <i>Chlorella vulgaris</i> - parâmetro a*.....	87
Figura 40 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com <i>Chlorella vulgaris</i> - parâmetro C.....	88
Figura 41 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com <i>Chlorella vulgaris</i> - parâmetro h°.....	89
Figura 42 - Poster apresentado em comunicação no congresso :8 th Eurofoodwater conference. Timisoara, Roménia, 25 a 27 Maio de 2014	107
Figura 43 - Poster apresentado em comunicação no congresso :FoodInnova, Concordia Argentina, 20 a 23 de Outubro de 2014	108
Figura 44 - Poster apresentado em comunicação oral/poster no Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura – VII Firma Machala, Equador, 18 a 21 de Novembro	109
Figura 45 - <i>Power bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i> (produto analisado através do teste de aceitabilidade)	110
Figura 46 - Preparado mediterrânico com <i>Chlorella vulgaris</i> aplicado em queijo “Philadelphia”	110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Datas importantes no cultivo e processamento de algumas microalgas/cianobactérias	4
Tabela 2 - Composição nutricional alimentos/microalgas (% por matéria	10
Tabela 3 - Principais especificações das amostras de <i>Chlorella vulgaris</i> utilizadas no trabalho experimental	24
Tabela 4 - Soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> , respetivas percentagens de água e açúcar e binómios aplicados.....	25
Tabela 5 - Compostos e quantidades utilizadas na preparação das soluções tampão e respetivo pH final.....	26
Tabela 6 - Compostos e quantidades utilizadas na preparação das soluções acidificadas com <i>Spirulina</i> spp. e respetivo pH final.....	27
Tabela 7 - Quantidades de sumo de limão, <i>Spirulina</i> spp. e <i>Chlorella vulgaris</i> usadas na preparação das soluções.....	28
Tabela 8 - Caracterização microbiológica das amostras de <i>Chlorella vulgaris</i> dos 3 lotes utilizados (informações constantes do boletim analítico cedido pelo fornecedor)	30
Tabela 9 – Formulações e respetivas percentagens <i>smoothies</i> aplicação de <i>Chlorella vulgaris</i>	32
Tabela 10 - Componentes e respetivas percentagens utilizadas para formulação do “preparado” para incorporação de <i>frushapes</i>	34
Tabela 11 - Ingredientes e respetiva percentagem do “preparado salgado” com <i>Chlorella vulgaris</i>	36
Tabela 12 - Formulação e respetivas percentagens do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	37
Tabela 13 - Formulação e respetivas percentagens da solução de gotejamento (solução de alginato + pectina).....	39
Tabela 14 - Formulação e respetivas percentagens do “preparado” de <i>power bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i>	39
Tabela 15 - Valores de p obtidos a partir do teste de Tukey que compara a amostra A_3 com as restantes amostras.....	47
Tabela 16 - Resultados análises microbiológicas após aplicação de diferentes binómios de soluções com 1% de <i>Chlorella vulgaris</i>	59

Tabela 17 - Formulações de <i>smoothies</i> com <i>Chlorella vulgaris</i>	60 -
Tabela 18 - Valores de pH e °Brix após preparação e 24 horas dos <i>smoothies</i> desenvolvidos....	61 -
Tabela 19 - Valores de diversos minerais e quantidades correspondentes de <i>Chlorella vulgaris</i> a adicionar	62 -
Tabela 20 - Médias parâmetros de cor (L*, a*, b*, C e h°) de soluções <i>Chlorella vulgaris</i> - dia 0.	82
Tabela 21 - Valores de p obtidos a partir do teste ANOVA para os diferentes dias de amostragem das soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> (resultados de todos os dias de amostragem)	82
Tabela 22 - Médias parâmetros de cor (L*, a*, b*, C e h°) de soluções <i>Chlorella vulgaris</i> - dia 2.	83
Tabela 23 - Médias parâmetros de cor (L*, a*, b*, C e h°) de soluções <i>Chlorella vulgaris</i> - dia 5 .	83
Tabela 24 - Médias parâmetros de cor de soluções tampão de citrato-fosfato após preparação	84
Tabela 25 - Médias parâmetros de cor de soluções tampão de citrato-fosfato após 24 horas.....	84
Tabela 26 - Médias parâmetros de cor de soluções tampão de citrato-fosfato após 24 horas e posterior pasteurização.....	85
Tabela 27 - Valores de p obtidos a partir do teste ANOVA para as diferentes soluções tampão com <i>Chlorella vulgaris</i> (o teste diz respeito aos 3 dias de amostragem)	85
Tabela 28 – Médias parâmetros de cor de soluções acidificadas de <i>Spirulina</i> spp antes e após pasteurização	90
Tabela 29 - Médias parâmetros de cor soluções <i>Spirulina</i> . e <i>Chlorella</i> antes/após pasteurização ..	90
Tabela 30 - Médias parâmetros de cor do preparado com <i>Chlorella vulgaris</i> antes/após pasteurização	90
Tabela 31 - Valor de p de cada parâmetro de cor obtido através do teste ANOVA para as soluções de <i>Spirulina</i> spp.....	91
Tabela 32 - Resultados teste Tukey para parâmetro L* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Spirulina</i> spp.	91
Tabela 33 - Resultados teste Tukey para parâmetro a* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Spirulina</i> spp.	91
Tabela 34 - Resultados teste Tukey para parâmetro b* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Spirulina</i> spp.	91
Tabela 35 - Resultados teste Tukey para parâmetro C (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Spirulina</i> spp.	92

Tabela 36 - Resultados teste Tukey para parâmetro h° (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Spirulina</i> spp.	92
Tabela 37 - Valor de p parâmetros de cor obtidos através do teste ANOVA para as soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	92
Tabela 38 - Resultados teste Tukey para parâmetro L^* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	92
Tabela 39 - Resultados teste Tukey para parâmetro a^* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	93
Tabela 40 - Resultados teste Tukey para parâmetro b^* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	93
Tabela 41 - Resultados teste Tukey para parâmetro C (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	93
Tabela 42 - Resultados teste Tukey para parâmetro h° (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina</i> spp.	93
Tabela 43 - Valores de p obtidos a partir do teste ANOVA para os diferentes tratamentos térmicos aplicados ao preparado com <i>Chlorella vulgaris</i>	94
Tabela 44 – Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro L^* do preparado com <i>Chlorella vulgaris</i>	95
Tabela 45 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro a^* do preparado com <i>Chlorella vulgaris</i>	95
Tabela 46 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro b^* do preparado com <i>Chlorella vulgaris</i>	96
Tabela 47 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro C do preparado com <i>Chlorella vulgaris</i>	96
Tabela 48 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro h° do preparado com <i>Chlorella vulgaris</i>	97
Tabela 49 – Médias parâmetros de cor dos <i>frushapes</i> na forma seca ao longo de 42 dias de amostragem	98
Tabela 50 - Médias parâmetros de cor do preparado onde se aplicaram os <i>frushapes</i> ao longo de 42 dias de amostragem	98
Tabela 51 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> na sua forma seca.....	98

Tabela 52 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor do preparado com <i>frushapes</i>	99
Tabela 53 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro L* dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> aplicados em preparado.....	99
Tabela 54 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro b* dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> na sua forma seca	99
Tabela 55 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro C dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> na sua forma seca.....	100
Tabela 56 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro h° dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> na sua forma seca	100
Tabela 57 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro a* dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> na sua forma seca	100
Tabela 58 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro L* dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> na sua forma seca	101
Tabela 59 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro h° dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> aplicados em preparado.....	101
Tabela 60 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro a* dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> aplicados em preparado.....	102
Tabela 61 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro b* dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> aplicados em preparado.....	102
Tabela 62 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro C dos <i>frushapes</i> de banana com <i>Chlorella vulgaris</i> aplicados em preparado.....	102
Tabela 63 - Médias parâmetros de cor do “Preparado mediterrânico” ao longo de 21 dias de amostragem	103
Tabela 64 - Médias parâmetros de cor das <i>Power Bubble</i> ao longo de 21 dias de amostragem	103
Tabela 65 - Médias parâmetros de cor da calda de conservação das <i>Power Bubble</i> ao longo de 21 dias de amostragem	103
Tabela 66 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	103
Tabela 67 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro L* do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	104
Tabela 68 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro a* do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	104

Tabela 69 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro b^* do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	104
Tabela 70 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro C do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	104
Tabela 71 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro h° do “Preparado mediterrânico” com <i>Chlorella vulgaris</i>	105
Tabela 72 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor das <i>Power Bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i>	105
Tabela 73 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor da calda de conservação das <i>Power Bubble</i> com <i>Chlorella vulgaris</i>	105

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°Brix	Teor de sólidos solúveis
CP	Componente principal
<i>et al.</i>	e colaboradores
FDA	Food and Drug Administration
g	Grama
GRAS	Generally Recognized As Safe
I&D	Inovação e Desenvolvimento
ISO	International Organization for Standardization
kg	Quilograma
min	Minutos
ml	Mililitro
MRD	Maximum Recovery Diluent
PCA	Plate Count Agar
RCM	Reinforced Clostridial Medium
S&A	Sociedade Anónima
T	Temperatura
UFC	Unidades formadoras de colónias
YGC	Yeast extract Glucose Chloramphenicol
ΔE*	Varição total de cor

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem como principal objetivo, a avaliação e o desenvolvimento de produtos alimentares com incorporação da microalga *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) e foi desenvolvido na empresa Frulact S.A., na Maia.

A Frulact, S.A. é um grupo empresarial que iniciou a sua atividade no ano de 1987. Esta empresa é líder ibérico em preparados de fruta e é fornecedora dos setores de laticínios, gelados, pastelaria e bebidas. A empresa opera atualmente em Portugal (onde dispõe de 3 unidades fabris situadas na Maia, Ferro e Tortosendo), França, Marrocos (no qual dispõe de 2 unidades fabris), África do Sul e recentemente apostou no seu alargamento para os Estados Unidos com a construção de uma nova unidade fabril. Os seus clientes são multinacionais como a Nestlé, Danone, Unilever, Lactalis ou a Leche Pascual em Espanha. Para além de fornecerem grandes nomes da indústria alimentar, esta empresa gera produtos de marca própria (Fru, Fru – Fruits For You e Benefit) nomeadamente *smoothies*, doces, sumos concentrados, snacks de fruta e baby food. Apesar do seu forte ser a atuação na conceção, desenvolvimento e produção de preparados de fruta, esta empresa consegue despender parte do seu lucro em prol da investigação e inovação representados no Frutech (Centro de Inovação e Tecnologia Agro-Alimentar).

O conhecimento, a inovação e a segurança alimentar são as forças motrizes desta empresa e são estes valores que fazem desta líder no seu mercado de atuação.

1.1 Contextualização do tema

A necessidade crescente de inovação e de aumento de competitividade por parte das indústrias alimentares resultam na procura e no desenvolvimento de produtos inovadores que proporcionem ao consumidor novas sensações. Para além da inovação, as indústrias preocupam-se em responder às necessidades mais exigentes dos seus consumidores apresentando-lhes quase diariamente novos produtos.

Com isto pretendem não só despertar novas impressões, mas também a contemplar algumas das necessidades básicas da população em geral. De modo a suprir estas necessidades surge a possibilidade da incorporação de microalgas, em concreto da microalga *Chlorella vulgaris* em matrizes alimentares.

As algas, apesar de serem utilizadas desde há muito tempo na alimentação humana, não fazem parte da dieta da maioria dos consumidores, com exceção de países como o Japão e os Estados Unidos onde começa já a verificar-se um grande volume de novos produtos. É neste contexto que a **Frulact (I&D)**, com uma posição dominante na vertente de inovação em Portugal, propõe o desenvolvimento de produtos que na sua composição contenham a microalga *Chlorella vulgaris*.

1.2 Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo a incorporação da microalga *Chlorella vulgaris* em matrizes alimentares. Neste estudo pretende-se também avaliar o comportamento da microalga face a diferentes fatores externos, nomeadamente o pH, a temperatura, a concentração, entre outros. No final do trabalho pretende-se não só conhecer e caracterizar a microalga *Chlorella vulgaris* mas também obter produtos viáveis não só tecnologicamente, mas, essencialmente, apelativos para o consumidor e com potencial para lançamento no mercado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados alguns dos fundamentos teóricos que suportaram o trabalho prático. Em cada temática são apresentados os aspetos mais relevantes para a compreensão dos resultados obtidos em cada ponto do procedimento experimental.

2.1 Microalgas

O termo “alga”, vulgarmente utilizado, descreve um “organismo simples, unicelular ou pluricelular, autotrófico, que apresenta clorofila e outros pigmentos fotossintéticos” na sua composição (Dicionários, 2013). Geralmente estes sistemas são compostos por um simples corpo vegetal (vulgarmente conhecido como “talo”) e não possuem qualquer tipo de estrutura auxiliar (por exemplo raízes, tronco ou folhas), tal como as plantas terrestres. Inicialmente a aplicação deste termo era limitada às plantas marinhas macroscópicas (como é o caso das algas), mas nos dias de hoje, também os organismos microscópicos (por exemplo microalgas) estão incluídos neste grupo (Posten e Walter, 2012).

A utilização de microalgas pelos humanos na alimentação encontra um dos seus primeiros registos há 2000 anos atrás, no qual os chineses utilizavam a espécie *Nostoc* (atualmente classificada como cianobactéria) quando se registavam períodos de elevada escassez alimentar. (Priyadarshani e Rath, 2012; Spolaore *et al.*, 2006). Também o povo azteca utilizava diversas microalgas (por exemplo *Spirulina*, hoje classificada como cianobactéria), na sua alimentação diária (Bewicke e Potter, 2009). Apesar de representarem uma das formas mais primitivas da cadeia alimentar, só em 1950 e devido ao aumento da população mundial, algumas microalgas foram objeto de estudo mais intensivo e, portanto, foram devidamente caracterizadas, surgindo então como fontes alternativas de determinados componentes. Através da constatação do elevado valor nutricional destes organismos (elevados teores de proteína), surge, cerca de 10 anos depois, a possibilidade da sua introdução no mercado alimentar e da sua produção em grande escala. Na tabela 1 é possível observar alguns dos marcos históricos na produção e cultivo de alguns tipos de microalgas.

Esta produção iniciou-se com a *Chlorella* no Japão e é mantida até aos dias de hoje. No entanto, só em 1970 é atribuída uma importância acrescida a estes organismos, devido à possibilidade de poderem representar uma fonte de energia renovável, através da capacidade que possuem de fixar o dióxido de carbono. Este componente depois de fixado é utilizado na fotossíntese, resultando em compostos com interesse tecnológico e com a vantagem de serem produzidos a um custo muito reduzido (Harun *et al.*, 2010; Spolaore *et al.*, 2006; Varfolomeev e Wasserman, 2011). Pelo facto de se terem tornado organismos com importância para os humanos, no ano de 1980 existiam já 46 unidades industriais de grande escala na Ásia que produziam em conjunto cerca de 1000 kg de diversos tipos de microalgas (maioritariamente *Chlorella*) por mês (Spolaore *et al.*, 2006). Nos dias de hoje, a comercialização de biomassa microalgal é um negócio não só bastante evoluído e diversificado como também de elevada rentabilidade. Segundo Posten e Walter (2012) estima-se que sejam comercializadas cerca de 5000 toneladas/ano de diversos tipos de microalgas exclusivamente para consumo humano.

Tabela 1 - Datas importantes no cultivo e processamento de algumas microalgas/cianobactéria (Adaptado de Pulz e Gross, 2004)

Microalga/Cianobactéria	Primeiro registo	
	Ano de cultivo	Ano de processamento
<i>Spirulina</i>	1965	1985
<i>Chlorella</i>	1975	1994
<i>Dunaliella</i>	1982	1985
<i>Odontella</i>	2002	2003

Com o evoluir do mercado e das novas tecnologias, para além das numerosas aplicações comerciais já conhecidas, foram identificadas e caracterizadas diferentes microalgas que para além de serem nutricionalmente muito ricas, apresentam elevado interesse tecnológico para diversos tipos de indústrias como, por exemplo, a produção de *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina que pode ser utilizada como corante natural em alguns tipos de indústrias. Atualmente, o número de espécies de microalgas que se encontra à superfície da terra, está estimado entre 20.000 e vários milhões, das quais apenas cerca de 50.000 foram identificadas até à data (Posten e Walter, 2012).

Das identificadas até ao presente, somente se conhece a composição química de algumas e apenas 15 espécies suscitam interesse para exploração (na figura 1 encontram-se representadas 2 tipos de microalgas com valor acrescentado para os humanos) (Posten e Walter, 2012).

A classificação de cada uma das espécies de microalgas existentes é realizada tendo por base as várias características morfológicas. Assim, características como a pigmentação, a organização das membranas fotossintéticas e outras, são essenciais para a distribuição de cada uma destas por classes. A primeira classificação por espécies feita por Lee (1989) é a que ainda hoje perdura, segundo ele existem quatro classes nas quais se enquadram cada uma das microalgas: *Cyanophyceae* (alga azul-verde), *Chlorophyceae* (alga verde), *Bacillariophyceae* (inclui as diatomáceas) e *Chrysophyceae* (inclui as algas douradas) (Chacon-Lee e Gonzalez-Marino, 2010; Posten e Walter, 2012; Richmond, 2008).

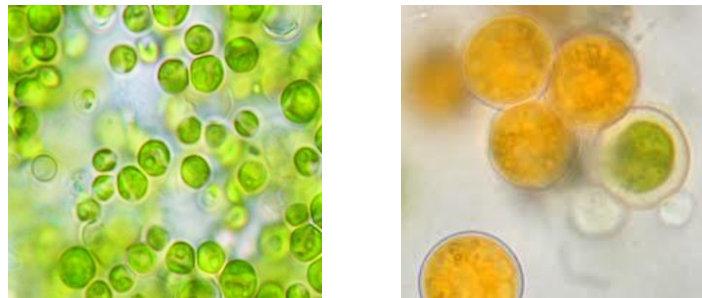


Figura 1 - Espécies de microalgas produzidas à escala industrial. Da esquerda para a direita: *Chlorella vulgaris* (<http://harmonicarts.ca/2013/04/chlorella-chlorella-vulgaris/>) e *Dunaliella Salina* (<http://bioage.com/ingredients.html>)

Estes organismos de pequenas dimensões apresentam a capacidade de realizar o processo de fotossíntese, no qual convertem a energia solar em energia química (Harun *et al.*, 2010; Priyadarshani e Rath, 2012). Este mecanismo de conversão é em grande parte similar ao que ocorre nas plantas terrestres, nas quais a fotossíntese realiza-se em complexos específicos denominados de cloroplastos. No entanto, as microalgas mostram-se geralmente mais eficazes na conversão da energia solar em biomassa, quando comparadas com a maioria das plantas, devido à sua estrutura celular simples e também por se encontrarem submersas em meio aquoso, com fácil acesso a água, CO₂ e outros nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento (Chacon-Lee e Gonzalez-Marino, 2010).

Para além disso, são extremamente versáteis ao ponto de poderem ser encontrados não só em ecossistemas aquáticos (água salgada ou água doce), como também em ambientes terrestres, desde que estejam disponíveis a luz solar e alguns nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (Varfolomeev e Wasserman, 2011). O desenvolvimento microalgal é determinado por vários fatores como a qualidade/intensidade luminosa, a temperatura, a concentração de nutrientes, o oxigénio, o dióxido de carbono, a composição mineral do meio que lhe dá origem e o pH (Varfolomeev e Wasserman, 2011).

Atualmente existem dois tipos de sistemas para a produção e desenvolvimento de microalgas: o sistema aberto (tanques abertos ou “*open ponds*”) e o sistema de produção através de sistemas fechados denominados de fotobioreatores (PBR) (Richmond, 2008) (figura 2).

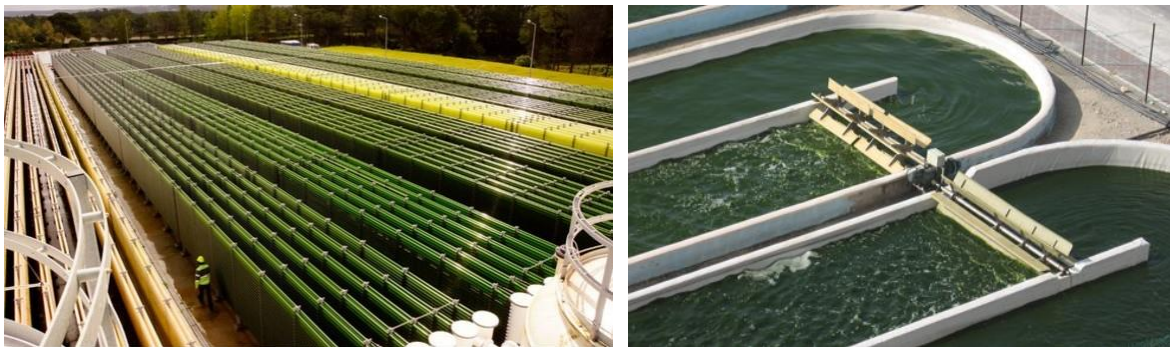


Figura 2 - Sistemas de produção de microalgas. Produção em fotobioreatores nas instalações da “Allma” (à esquerda) e produção em tanques abertos (à direita) (<http://www.texasvox.org/tag/global-warming/>)

O cultivo para comercialização destes organismos através dos “*open ponds*” é ainda hoje o mais utilizado em todo o mundo, não só porque o modo de operação é mais simples e barato, mas também porque o tempo de vida útil destas estruturas é superior (Richmond, 2008). Por outro lado, os custos de manutenção necessários neste tipo de estruturas são mais baixos, quando comparados com os necessários na produção através de fotobioreatores (Harun *et al.*, 2010). Este tipo de produção, pode assumir diversas formas e tamanhos, mas atualmente os 3 tipos mais utilizados para a produção de microalgas são: sistemas inclinados, tanques circulares e lagoas *raceway* (Harun *et al.*, 2010; Richmond, 2008). A cultura das microalgas utilizando este tipo de estruturas, acontece em grandes espaços abertos que geralmente dispõem de canais que direcionam o fluxo de água.

Para além das estruturas mencionadas, este tipo de sistema possuiu pás rotativas, que agitam a água e que mantêm não só as culturas uniformemente distribuídas pelo espaço disponível, como também tem a capacidade de manter a temperatura constante. Neste tipo de sistemas o desenvolvimento das culturas é feito de uma forma natural (Richmond, 2008). Como se tratam de estruturas abertas, o controlo das condições de produção (pH, temperatura, intensidade luminosa, concentração de oxigénio dissolvido) é mais difícil e a possibilidade de ocorrência de contaminações por predadores é muito maior do que nos sistemas fechados (Harun *et al.*, 2010; Varfolomeev e Wasserman, 2011). Porque a probabilidade de contaminação é elevada e como maioritariamente se pretende obter microalgas para utilização nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar, a produção tem de obedecer, necessariamente, às boas práticas de fabrico, o que leva quase sempre à necessidade de colocação de parte deste tipo de estruturas (Posten e Walter, 2012).

Alternativamente à produção de biomassa microalgal, através de sistemas abertos, existe a produção em estruturas fechadas denominadas de fotobioreatores. Um fotobioreator pode ser definido como “um sistema de cultura fototrófico, em que a fonte luminosa atravessa as paredes transparentes do reator, até chegar às células da cultura” (Richmond, 2008). Neste caso as culturas de microalgas que se pretendem obter são cultivadas em sistemas fechados onde é possível o controlo de todo o processo de produção (é possível controlar fatores como o pH, intensidade luminosa, entre outros) reduzindo o risco de contaminações. Para além de serem reatores, cujas condições de produção são mais facilmente controladas, estes sistemas são vantajosos porque apresentam um baixo consumo de energia e elevada capacidade de transferência de massa, reduzem a necessidade de oxigénio a fornecer à cultura, não apresentam “zonas escuras” onde não há produção e desenvolvimento das culturas, apresentam elevada eficiência fotossintética e permitem o desenvolvimento de culturas que não são possíveis nos sistemas abertos (Harun *et al.*, 2010). Para além disso, neste tipo de produção, é também possível “manipular” a composição mineral das microalgas, sendo possível obter lotes com perfis nutricionais muito diferentes. As únicas desvantagens deste tipo de sistema estão relacionadas com o investimento inicial e o custo de manutenção que apesar de serem elevados compensam quando se pretende obter um produto final de elevada qualidade que permita a sua utilização em indústrias de fármacos, cosméticos ou alimentares.

Para além da sua versatilidade e da sua fácil adaptação a meios muitos distintos, as microalgas contêm vários compostos bioativos que podem ser utilizados para uso comercial (figura 3). As microalgas podem ser usadas para produzir um diversificado leque de metabolitos como é o caso das proteínas, lípidos, hidratos de carbono, carotenoides ou vitaminas que podem ser utilizados na alimentação de humanos e animais, na área dos cosméticos e ainda na produção de energia (Priyadarshani e Rath, 2012).

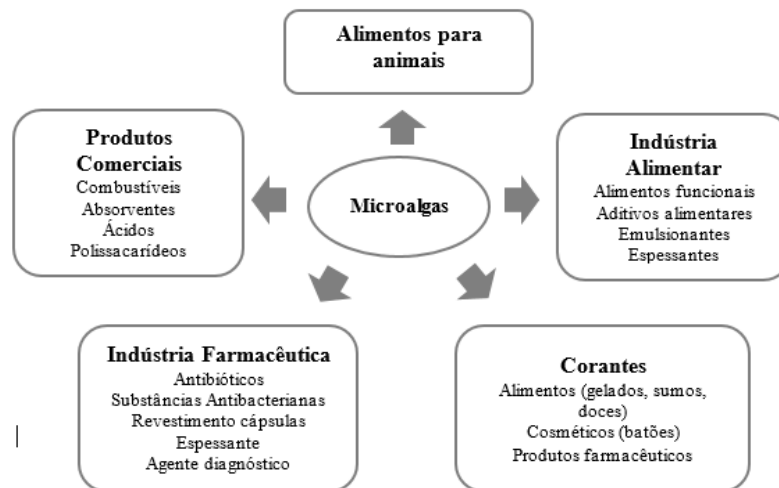


Figura 3 - Uso microalgas em diversos tipos de indústrias (adaptado Varfolomeev and Wasserman, 2011)

No caso da indústria alimentar a utilização de microalgas restringe-se maioritariamente ao uso da microalga *Chlorella vulgaris*. Para além das propriedades nutricionais apresentadas por esta é também uma das poucas que foi reconhecida e obteve o estatuto de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) reconhecido pela FDA, portanto segura para consumo humano. Para além deste reconhecimento esta microalga não integra a lista de produtos “novel food” e portanto a sua colocação no mercado não está sujeita ao regulamento relativo a novos alimentos. Por se tratar de um ingrediente reconhecido legalmente, surge então neste contexto a possibilidade da sua incorporação no desenvolvimento de novos produtos. Pelas razões enunciadas esta microalga será aquela que dominará o interesse e terá maior enfoque no trabalho desenvolvido que se apresenta.

2.2 *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) – Características gerais

O nome *Chlorella* é uma conjugação do grego (*chloros*, que significa verde) e do latim (*ella*, que significa coisa pequena) (Lee *et al.*, 1998). A primeira classificação de uma cultura pura de *Chlorella vulgaris* data de 1890 na Holanda pelo microbiologista M.W. Beijerinck (Bewicke e Potter, 2009). Apesar de esta só ter sido classificada em meados dos anos 90 estima-se que habite a terra há mais de 2 bilhões de anos e que seja um ancestral de alguns vegetais como os espinafres e as abóboras (Kanno, 2005). Geralmente o diâmetro das células desta microalga varia entre os 2 e os 10 microm (um pouco mais pequeno que um glóbulo vermelho) e uma única célula é capaz de se dividir em quatro a cada 20 horas (a esta taxa de produção seria possível originar uma quantidade tal capaz de cobrir a superfície da terra em 63 dias, o que felizmente acaba por não acontecer devido a elementos naturais que limitam a sua reprodução) (Lee *et al.*, 1998). Por outro lado, a sua composição em clorofila é muito superior quando comparada com outras plantas o que faz com que a taxa de eficácia do processo de fotossíntese seja muito superior quando comparada com outros organismos (Kanno, 2005). Na figura 4 podem observar-se fotos de *Chlorella vulgaris* seca em pó e células observadas ao microscópio.

A produção desta microalga (sistemas abertos e/ou fotobioreatores) é realizada em cerca de 70 empresas espalhadas por todo o mundo. O maior produtor de *Chlorella* é a empresa *Taiwan Chlorella Manufacturing & Co. Ltd* na Tailândia, responsável por uma produção anual de 330 toneladas em sistemas fechados e cerca de 300 toneladas numa unidade em Hai-Nan na China. Na Europa a produção de grande parte de *Chlorella vulgaris* é feita na Alemanha pela empresa *Roquette Klotze GmbH & Co. KG* em fotobioreatores com 500 km de extensão (Posten e Walter, 2012). Em Portugal, a empresa “*Allma*” começa a dar os primeiros passos na produção de microalgas com particular atenção para a *Chlorella vulgaris* produzida em fotobioreatores. Quando esta microalga se destina a fins alimentares a sua produção é realizada preferencialmente em fotobioreatores, reduzindo a contaminação ou destruição das culturas por predadores.

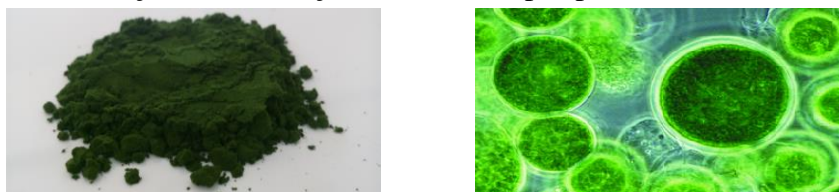


Figura 4 - *Chlorella vulgaris* sob a forma seca (à esquerda) células de *Chlorella vulgaris* (à direita) (<http://algaetechinternational.com/new/wp-content/uploads/2014/01/dermochlorella.jpg>)

2.2.1 *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) - Perfil nutricional

Esta microalga é de tal modo pequena, que as suas células apenas são perceptíveis com recurso a um microscópio. Apesar do seu tamanho reduzido, consegue armazenar nutrientes importantes para a dieta do ser humano em grandes quantidades sendo conhecido por muitos como um “super alimento”. Para além das elevadas quantidades de clorofila, esta microalga é rica em vitaminas, minerais, proteínas e aminoácidos essenciais. Uma das características mais marcantes e interessantes do ponto de vista nutricional é o alto teor em proteína apresentado por esta (aproximadamente 60%) podendo comparar-se, no que diz respeito a esta característica a um ovo (Cho *et al.*, 2011). A quantidade é de tal modo elevada, que praticamente nenhum alimento integrante da dieta consegue igualar este valor (a porção de proteína chega a ser 8 vezes maior quando comparada com o arroz) (Spolaore *et al.*, 2006) (tabela 2). Para o ser humano, as elevadas quantidades de proteína que se obtêm a partir do consumo desta microalga são interessantes do ponto de vista nutricional porque a sua ingestão controlada contribui, não só para o crescimento e manutenção da massa muscular como também para a manutenção de ossos normais (Regulamento nº 432 de 2012).

Tabela 2 - Composição nutricional alimentos/microalgas (% por matéria seca) adaptado Spolaore *et al.*, 2006

Tipos de produtos	Proteína	Hidratos de Carbono	Lípidos
Fermento Padeiro	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7

Da composição desta microalga constam também os oito aminoácidos essenciais (treonina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, valina) constituintes das proteínas e a quantidade destes compara-se a um derivado animal, exceto na quantidade de metionina que é ligeiramente menor.

Contêm também vitamina C, E e K, betacaroteno, vitaminas B1, B2, B6, B12, ácido fólico, biotina, entre outros (Lee *et al.*, 1998; Priyadarshani e Rath, 2012). Apresenta também um conteúdo em minerais muito interessante, possuindo fósforo, potássio, magnésio, ferro, cálcio, manganês, zinco e cobre sendo que o conteúdo nos diversos minerais pode ser manipulado, variando as condições de produção da microalga (Lee *et al.*, 1998; Priyadarshani e Rath, 2012).

2.2.2 *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) – Fonte de clorofila

As microalgas são amplamente conhecidas pelo facto de apresentarem um elevado conteúdo em proteína e outros nutrientes. Para além do seu elevado conteúdo em diversos nutrientes a *Chlorella vulgaris*, apresenta grande quantidade de clorofila (Bewicke e Potter, 2009; Kanno, 2005; Lee *et al.*, 1998), pigmento responsável pela cor verde característica de diversos frutos e vegetais, que se encontra em corpúsculos celulares designados de cloroplastos onde ocorre o processo de fotossíntese da grande maioria das plantas. Para além da sua utilização como corante natural em alimentos, em fármacos e outras aplicações, este pigmento pode potenciar alguns efeitos benéficos na saúde de quem o consome. Segundo alguns autores a clorofila funciona como um agente quelante, capaz de captar metais pesados que são posteriormente removidos do organismo (Harun *et al.*, 2010). Para além de atuarem na eliminação de metabolitos prejudiciais ao organismo é possível enumerar algumas propriedades terapêuticas que podem estar relacionadas com a ingestão de clorofila entre as quais: o fornecimento de ferro ao organismo de forma natural, aumentando os valores de hemoglobina no sangue e também a eliminação de toxinas, reparação celular e acelerador da taxa de crescimento celular (Bewicke e Potter, 2009). Do ponto de vista do consumidor a clorofila é sem dúvida benéfica quando falamos do seu potencial na saúde mas, para além das vantagens terapêuticas, este pigmento é amplamente utilizado pela indústria alimentar e farmacêutica na coloração de diversos produtos processados já que a sua cor verde intensa poderá estar associada à ideia de produtos mais naturais. Apesar de ser possível enumerar diversos aspetos positivos relacionados com o seu consumo, este pigmento apresenta como desvantagem a extrema sensibilidade a fatores externos como a temperatura e o pH, cujas reações podem ser de tal modo agressivos que não é possível reverter os seus efeitos (Koca *et al.*, 2007).

Segundo Schwartz e Lorenzo (1990), que estudaram as alterações que ocorrem na clorofila durante o processamento, este pigmento, quando sujeito a tratamentos térmicos mais prolongados, degrada-se e forma um composto conhecido por feofitina, responsável por acentuadas alterações de cor. As temperaturas de processamento elevadas provocam não só a degradação das clorofilases como também das enzimas responsáveis pela cor verde, originando produtos de cor verde azeitona. Essa degradação é mais acentuada quando o teor de humidade de um determinado produto é mais elevado. Também foi estudado que à temperatura ambiente a clorofila é extremamente estável mas, quando sujeita a temperaturas superiores a 50 °C, perde grande parte dessa estabilidade, podendo ocorrer reações irreversíveis de cor. Por outro lado a degradação da clorofila em feofitina pode também ser desencadeada pelo pH. A taxa de degradação aumenta com a diminuição do valor de pH. Durante esta reação os iões de hidrogénio transformam a clorofila em feofitina, através da sua substituição pelo ião de magnésio (Andres-Bello *et al.*, 2013).

2.2.3 *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) como alimento

A microalga *Chlorella* é uma das formas mais primitivas e das primeiras a aparecer no planeta terrestre e, em conjunto com outras microalgas, representam a base da cadeia alimentar. Como mencionado atrás, apesar de existirem registos da sua utilização na alimentação humana que datam do tempo dos aztecas só recentemente é que este ingrediente começou a ser parte integrante de alguns produtos alimentares processados, isto porque se começa a perceber que estes microrganismos podem ser uma fonte alternativa de diversos nutrientes. Por serem de tal modo ricos nutricionalmente, podem substituir alguns dos alimentos indispensáveis à dieta humana ajudando a responder à escassez de alimentos, que começa a ser preocupante (Bewicke e Potter, 2009). Neste sentido, a cultura desta microalga têm sido realizada tendo em conta a sua utilização na elaboração de alimentos e na obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado.

Os principais obstáculos da sua incorporação em alimentos prendem-se com o fato de esta conferir uma cor verde muito acentuada aos produtos, o que poderá ser percebido pelo consumidor como negativo. Por outro lado, o sabor e cheiro característicos a mar poderão limitar também a sua incorporação em alguns tipos de alimentos (Becker, 2007).

O mercado de alimentos, utilizando microalgas apresenta uma grande evolução em países como os Estados Unidos e o Reino Unido onde a microalga é parte integrante de massas, pães, iogurtes e algumas bebidas (figuras 5 e 6).

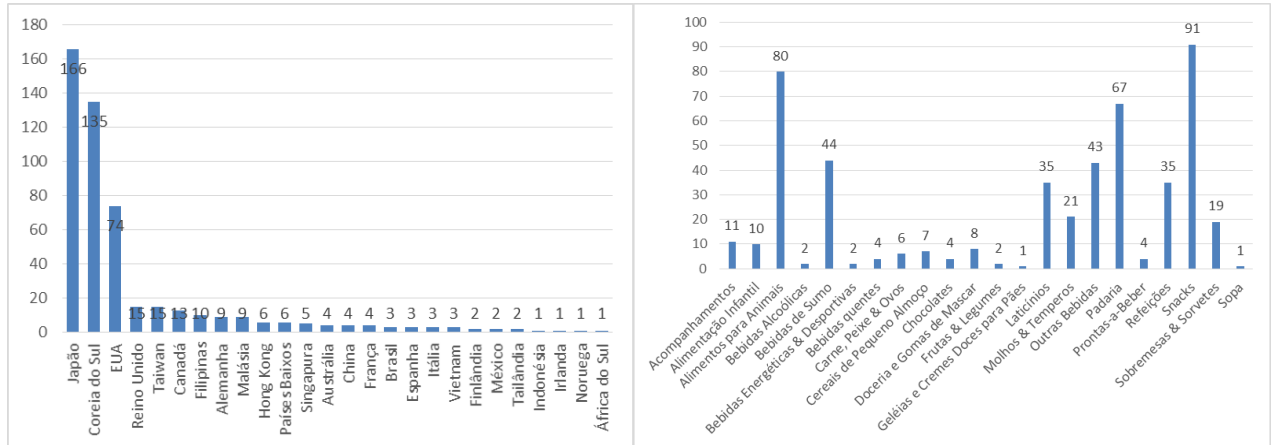


Figura 5 - Análise de mercado de produtos com *Chlorella vulgaris* (país e categoria) (Mintel, 2014)

Apesar de se ter registado um aumento no lançamento de produtos em países Europeus o Japão e os países asiáticos continuam a ser líderes no que diz respeito ao lançamento de formulações alimentares com esta microalga. No Japão a *Chlorella* é vulgarmente utilizada como um ingrediente do *wasabi* que integra o sushi mundialmente conhecido (Bewicke e Potter, 2009). Para além desta utilização são também já conhecidos vários snacks e bebidas que encontram na sua formulação a microalga.



Figura 6 - Produtos alimentares que se encontram atualmente à venda no mercado cuja composição contém a microalga *Chlorella vulgaris* (Mintel, 2014)

2.3 *Spirulina* spp. (*Arthrospira*)

A cianobactéria *Arthrospira*, comumente conhecida como *Spirulina* (anteriormente classificada como microalga) é também usada para consumo humano, porque tal como a microalga *Chlorella vulgaris* apresenta um elevado teor em proteína. Este organismo é também rico em ferro, ácidos gordos insaturados como é o caso do ácido γ -linolénico. A elevada quantidade de ácido γ -linolénico faz com que até à data seja um dos organismos. Possui também uma parede celular de fácil digestão e é uma das fontes naturais com maior quantidade de vitaminas do complexo B, nomeadamente a vitamina B12 (Posten e Walter, 2012).

Os maiores produtores de *Spirulina* spp. encontram-se na Ásia e nos EUA, sendo que 10% da produção mundial é proveniente da China que chega a produzir cerca de 350 toneladas por ano (Posten e Walter, 2012).

Para além de todas as vantagens nutricionais apresentadas por esta cianobactéria, esta foi reconhecida com o estatuto de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA, fazendo com que possa ser incorporada no desenvolvimento de novos produtos alimentares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os materiais e métodos utilizados ao longo de todo o procedimento experimental. Este capítulo está organizado em dois grandes subcapítulos: Métodos analíticos e Procedimento Experimental. No primeiro tópico é feita uma breve descrição da metodologia de medição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras. O segundo tópico aborda todos os procedimentos experimentais realizados em laboratório (sendo que alguns destes aparecem sob a forma de fluxograma), as matérias-primas utilizadas e respectivas percentagens, a caracterização da matéria-prima principal (microalga *Chlorella vulgaris*). Deste segundo tópico constam ainda as aplicações alimentares realizadas cuja composição de todas elas engloba a microalga em destaque neste trabalho.

3.1 Métodos analíticos

3.1.1 Medição de Cor

A aparência geral de um produto alimentar, fresco ou processado, é, sem dúvida, um atributo de qualidade sensorial que desempenha um papel fundamental na tomada de decisão da grande maioria dos consumidores. Apesar de muito abrangente, este termo, aparência geral, engloba características como o tamanho, a forma, a textura, o brilho, a cor entre outros. A cor, por sua vez, é um dos principais atributos avaliados pelo consumidor e como tal a percepção deste é utilizada para emitir opiniões sobre o estado e qualidade do produto, resultando desta a aceitação ou rejeição. Para além de dar indicações do estado do produto, a cor pode ajudar na recolha de informações, como por exemplo a severidade dos tratamentos térmicos a que os produtos foram sujeitos (Pathare *et al.*, 2013). De modo, a avaliar a cor em cada uma das aplicações descritas no ponto 3.2 foi utilizado o colorímetro portátil CR 400 (Konica Minolta, Japão) (Apêndice I), utilizando o iluminante D65, sendo os valores registados sob a forma das coordenadas L^* , a^* e b^* (CIELAB).

Para além disso, foram também avaliados os parâmetros C^* (croma), h° (tonalidade) e nos casos em que se considerou pertinente foi ainda calculada a variação total de cor (ΔE^*). O sistema de coordenadas L^* , a^* e b^* é representado numa escala em que os valores são oponentes, ou seja, o parâmetro a^* toma valores positivos para as cores avermelhadas (+a) e valores negativos para os esverdeados (-a), tal como o parâmetro b^* que assume valores positivos para as cores amareladas (+b) e valores negativos para os azulados (-b). O L^* representa a luminosidade de uma dada amostra, cujos valores podem variar entre 0 (preto perfeito) e 100 (branco perfeito) (Pathare *et al.*, 2013). As coordenadas C^* (croma) e h° (tonalidade, ângulo *hue*) contribuem, também, para a avaliação da cor de grande parte das matrizes alimentares. O parâmetro C^* (equação 1) representa o grau de saturação de uma dada cor, em que os valores mais elevados de croma correspondem a produtos cuja intensidade de cor é superior e mais facilmente perceptível pelo olho humano. Por outro lado, o ângulo *hue* (equação 2) representa a tonalidade e está diretamente relacionado com a diferença de absorvância em diferentes comprimentos de onda, sendo que um ângulo entre 0° e 360° representa tonalidade vermelha, enquanto os ângulos de 90° , 180° e 270° representam tons de amarelo, verde e azul, respetivamente. Este parâmetro é bastante utilizado na medição de cor de vegetais verdes, carne e frutas (Pathare *et al.*, 2013) (figura 7).

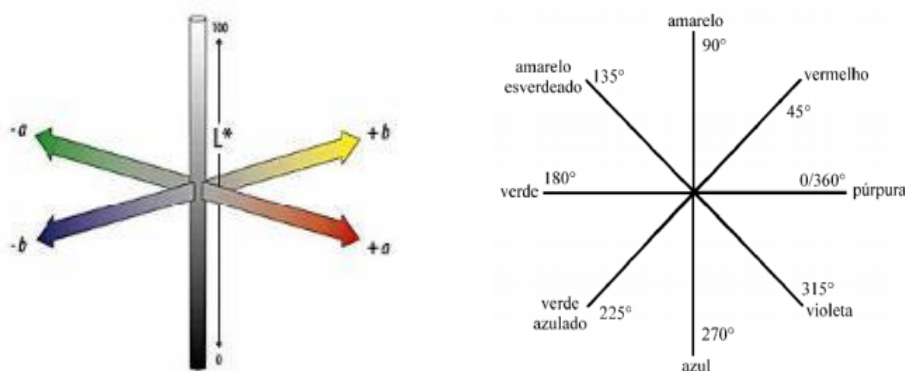


Figura 7 - Representações dos parâmetros de cor (à esquerda o espaço de cor em três dimensões adaptado de (Pathare *et al.*, 2013), à direita representação do ângulo *hue* adaptado de Machado)

Em alguns casos, os parâmetros anteriores, não são satisfatórios para detetar diferenças relevantes em alguns produtos, por isso o cálculo da ΔE^* (Equação 3) pode ser importante, já que facultar informações acerca da magnitude da diferença de cor entre amostras padrão e outras.

Os resultados obtidos podem ser classificados como muito distintos quando ΔE^* é maior que 3, distintos quando ΔE^* se encontra entre 1,5 e 3 e diferenças pequenas quando ΔE^* é menor que 1,5 (Pathare et al., 2013). Relativamente à determinação de cor realizada nas amostras, procedeu-se à calibração prévia do colorímetro utilizando uma placa de cerâmica branca, de acordo com os padrões pré-estabelecidos ($Y=86,50$; $x=0,3174$ e $y=0,3350$). O medidor foi de seguida posicionado no centro da placa e selecionado o modo “CALIBRATE”, esperando-se de seguida cerca de 3 segundos até ao aparecimento da mensagem “SUCCESSFUL CALIBRATION”. Depois de efetuada a calibração foi medida a cor da placa e os valores foram comparados com os valores teóricos. Os valores de cor foram lidos diretamente do aparelho e em cada ensaio foram realizadas cerca de 4 medições. As equações usadas para cálculo dos parâmetros C^* , hue e variação total de cor (C^* à esquerda, ângulo hue ao centro, variação total cor à direita) (Pathare et al., 2013) são as seguintes:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \Delta E^* = \sqrt{\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

3.1.2 Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)

O teor de sólidos solúveis foi medido diretamente utilizando um refratómetro (Apêndice I) RFM732, B+S (Bellingham+Stanley Ltd, Reino Unido) à temperatura ambiente (18 ± 2 °C) e os resultados expressos em °Brix. Anteriormente à medição, foi efetuada a calibração do equipamento utilizando água destilada como zero e confirmado o valor de 40 °Brix de uma solução de sacarose. Entre cada medição o aparelho foi lavado com água destilada.

3.1.3 Determinação do pH

Para a determinação do pH utilizou-se o potenciómetro (Apêndice I) Consort C860 (Consort byba, Bélgica). Previamente à realização das medições, o eléctrodo foi calibrado com as soluções padrão de pH 1,68; 4,00 e 7,00. A medição de pH em todas as amostras foi efetuada à temperatura ambiente (18 ± 2 °C). A evolução do pH foi medida de acordo com as especificações do método 981.12 da AOAC (2000).

3.1.4 Determinação da viscosidade

Para determinação da viscosidade foi utilizado o viscosímetro de Bostwick (Apêndice I). Este equipamento determina a viscosidade aparente ou consistência de um produto alimentar, sendo este, constituído por um compartimento, onde se dispõe o produto que se pretende determinar a viscosidade e por uma régua graduada de 23 cm (intervalos de 0,5 cm). Para a medição de viscosidade em algumas das amostras, colocou-se o produto (com o auxílio de uma colher) no compartimento até este estar completamente cheio e deixou-se escorrer o produto, por gravidade durante 60 segundos. No final deste tempo foi registada a distância percorrida pelo produto (Rao, 2007).

3.1.5 Análises microbiológicas

A) Preparação das amostras para as análises

O método de análise utilizado, após a obtenção das amostras iniciais, foi efetuado de igual forma, independentemente do tipo de microrganismo em análise e dos tratamentos prévios sofridos pelas amostras. Deste modo, pesaram-se 10 g representativas da amostra, com os devidos cuidados de assepsia em câmara de fluxo laminar SmartFAST (Faster Srl, Itália) para um frasco que continha previamente 90 mL de MRD (*Maximum Recovery Diluent*), esterilizado. Procedeu-se à correta homogeneização da amostra até se verificar a dissolução completa da mesma, obtendo-se com este passo a suspensão inicial (10^{-1}).

B) Preparação das diluições

Para ser possível a contagem dos microrganismos presentes numa determinada quantidade de amostra, foram efetuadas sucessivas diluições decimais. Estas diluições foram efetuadas retirando 1 mL para um tubo de ensaio que continha 9 mL do diluente, e assim sucessivamente, de modo a que as sementeiras das últimas diluições dessem resultados nulos.

C) Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C

A contagem de microrganismos totais foi efetuada a partir das diluições efetuadas anteriormente, retirando-se da suspensão-mãe e das diluições 1 mL de inóculo, utilizando para cada uma das diluições uma pipeta. O inóculo foi posteriormente colocado numa placa de Petri e adicionado meio de cultura (PCA, *plate count agar*), de acordo com a técnica de sementeira por incorporação. A contagem das colónias foi realizada após incubação a 30 °C durante 72 horas em condições de aerobiose e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g). Este método foi realizado de acordo com a NP 4405:2002.

D) Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi efetuada retirando-se da suspensão-mãe e das diluições 1 mL de inóculo e incorporando-o de seguida em placas de Petri vazias. De seguida, foi adicionado meio de cultura (YGC, *Yeast extract glucose chloramphenicol agar*), de acordo com a técnica de sementeira por incorporação. A contagem das colónias foi realizada após incubação a 25 °C durante 120 horas em condições de aerobiose e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g).

E) Contagem de microrganismos anaeróbios

A contagem de microrganismos anaeróbios foi efetuada retirando-se da suspensão-mãe e das diluições 1 mL de inóculo e incorporando-o de seguida em placas de Petri vazias. De seguida, foi adicionado meio de cultura (RCM, *Reinforced Clostridial Medium*), de acordo com a técnica de sementeira por incorporação. A contagem das colónias foi realizada após incubação a 30 °C durante 72 horas em condições de anaerobiose e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g). A fórmula utilizada para o cálculo dos microrganismos por grama de amostra foi a que a seguir se descreve:

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

N – Unidades formadoras de colónias/g de amostra inicial;

ΣC – Soma de todas as colónias contadas nas duas diluições sucessivas consideradas;

n1 – Corresponde ao número de placas consideradas na primeira diluição;

n2 – Corresponde ao número de placas consideradas na segunda diluição;

d – Corresponde ao fator de diluição da primeira diluição considerada.

3.1.6 Análise Sensorial

A análise sensorial desenvolvida ao longo do trabalho divide-se sucintamente em duas partes (ver figura 8): análise sensorial preliminar e análise sensorial dos produtos acabados (testes de aceitabilidade).

A) Análise Sensorial Preliminar

Na primeira parte do trabalho experimental a análise sensorial foi realizada pelas pessoas que estavam diretamente envolvidas no projeto (avaliação qualitativa – isto porque se tratavam de ensaios preliminares e de aprovação de conceito) que, após a elaboração dos produtos, davam sugestões de melhoria e formulações alternativas. O painel era composto por 4 pessoas que de uma maneira espontânea exprimiam a sua opinião geral acerca dos produtos, sendo os principais comentários anotados e, depois de analisados, utilizados na melhoria de formulações (figura 8). Através da avaliação preliminar deste painel foi possível obter dois produtos viáveis, do ponto de vista industrial e aceitáveis organolepticamente, que se selecionaram para otimização do processo e posterior avaliação da aceitabilidade dos consumidores.

B) Testes de aceitabilidade

Na segunda parte da análise sensorial foram realizados testes de aceitabilidade (Lawless e Heymann, 2010) a dois produtos “Preparado de legumes” com *Chlorella vulgaris* e *power bubble* de *Chlorella vulgaris*” (figura 8). Os dois produtos foram analisados em simultâneo e a meio da manhã que, tal como o meio da tarde, são consideradas as alturas mais adequadas do dia (antecedem ou procedem as horas das refeições principais) para a realização de testes de análise sensorial (Committee, 1985). A aceitabilidade destes produtos foi avaliada por 21 consumidores, colaboradores da Frulact (Maia) nos departamentos de compras, comerciais e de desenvolvimento/aplicações. A aceitabilidade dos consumidores foi registada numa ficha de prova (figura 9) com uma escala hedónica pontuada de 1 a 9, sendo que o 1 corresponde a “Desgosto extremamente” e 9 corresponde a “Gosto extremamente”. A aceitabilidade foi avaliada ao nível da “aparência geral”, “cor”, “cheiro” e “sabor”. Da ficha de prova constava ainda uma questão a qual consistia em perguntar aos provadores se comprariam um produto semelhante ao que estavam a analisar. Estes dois produtos foram avaliados tendo em conta a sua possível aplicação final, ou seja, no caso do “Preparado mediterrânico”, este foi aplicado em queijo “Philadelphia” (de modo a assemelhar com a aplicações já existentes no mercado de queijos com especiarias) e no caso das *Power bubble*, a prova foi efetuada diretamente, já que neste caso se pretendia avaliar isoladamente as características das mesmas.

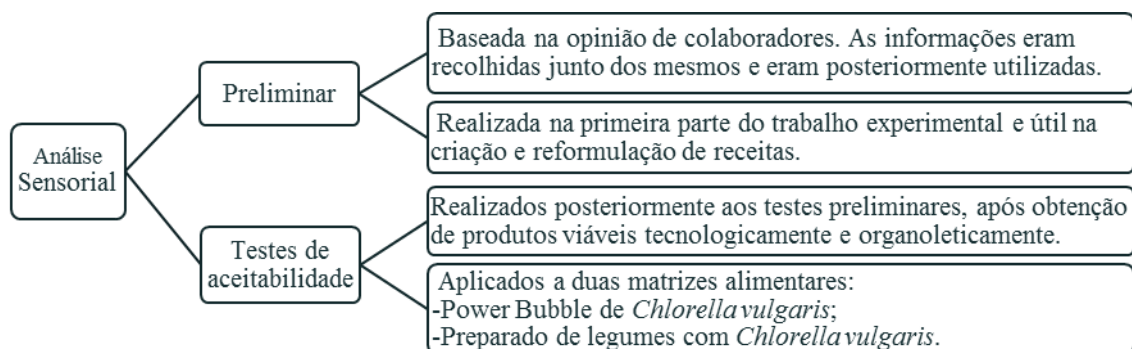


Figura 8 - Representação esquemática dos dois tipos de análise sensorial elaborados

Ficha Análise Sensorial – *Chlorella Vulgaris*

Nome Proveedor: _____

Data: __/__/__

1) Avalie a amostra, segundo a sua preferência, de acordo com a escala que a seguir se apresenta:

1. Desgosto extremamente
2. Desgosto muito
3. Desgosto
4. Desgosto ligeiramente
5. Nem gosto nem desgosto
6. Gosto ligeiramente
7. Gosto
8. Gosto muito

Característica	Creme para barrar com preparado tipo mediterrânico e <i>Chlorella vulgaris</i>	Power Bubble de <i>Chlorella vulgaris</i>
Aparência geral		
Cor		
Cheiro		
Sabor		
Compraria um produto semelhante a este	Sim <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>
	Não <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
	Talvez <input type="checkbox"/>	Talvez <input type="checkbox"/>

2) Outros comentários:

Obrigada pela sua colaboração!

Figura 9 - Ficha de prova fornecida para resultados teste de aceitabilidade

3.1.7 *Análise Estatística e tratamento de dados*

Com os resultados obtidos ao longo do procedimento experimental, foi necessário a construção das representações gráficas de cada parâmetro em estudo. Para a organização dos dados e posterior construção dos gráficos foi utilizado o *software* Microsoft Excel (Microsoft, Inc., EUA). Foi ainda realizada uma análise multivariada, análise de componentes principais, de modo a ser possível verificar diferenças entre as várias amostras ou grupos de amostras combinando toda a informação disponível (todas as variáveis). Posteriormente e de modo a verificar se estatisticamente os grupos de dados analisados apresentavam diferenças significativas (consideradas significativas quando o valor de *p* era inferior a 0,05), recorreu-se em primeiro lugar à análise de variância, utilizando o teste Anova – fator único e um teste *post hoc*, teste de Tukey, para identificar entre que amostras existem essas diferenças. Para tal foi utilizado o *software* STATISTICA versão 7 (StatSoft, Inc, USA).

3.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental encontra-se organizado em duas partes distintas. Na primeira parte (pontos 3.2.2 a 3.2.4) o tipo de análise efetuada teve como objetivo principal a realização de estudos preliminares de *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) antes da sua aplicação em matrizes alimentares. As análises efetuadas tiveram em consideração vários fatores que poderiam interferir no resultado final designadamente o pH, a temperatura e a combinação da microalga com outros componentes alimentares. Com os resultados obtidos nesta primeira parte do procedimento foi possível aplicar a microalga em matrizes alimentares (ponto 3.2.5), mas tendo em conta esses fatores limitantes estudados.

3.2.1 *Caracterização da matéria-prima principal (Chlorella vulgaris, em pó)*

A microalga *Chlorella vulgaris* é a matéria-prima principal deste trabalho, porque é o único ingrediente comum a todos os procedimentos e é aquele que protagoniza o papel mais importante em todo o trabalho experimental. As amostras da microalga foram cedidas pela empresa “Allma” (<http://www.allma.com/pt>), provenientes de 3 lotes diferentes (tabela 3).

A produção da microalga em qualquer um dos lotes foi realizada em fotobiorreatores fechados em condições controladas, em que a matéria-prima foi posteriormente seca e armazenada à temperatura ambiente. Este ingrediente encontrava-se sob a forma de um pó fino de cor verde com cheiro característico de mar. Esta matéria-prima quando adicionada a um meio aquoso apresenta dificuldades de dispersão e, ao longo do tempo, a microalga tende a depositar-se no fundo o que origina uma nítida separação de fases.

Tabela 3 - Principais especificações das amostras de *Chlorella vulgaris* utilizadas no trabalho experimental

Composição	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Hidratos de Carbono	21,5 g/100 g	16,8 g/100 g	14,6 g/100 g
Gordura	7,2 g/100 g	9,7 g/100 g	10,2 g/100 g
Proteína	53,6 g/100 g	59,1 g/100 g	59,2 g/100 g
Cinzas	12,4 g/100 g	10,5 g/100 g	11,4 g/100 g
Humidade	5,3 g/100 g	3,8 g/100 g	4,3 g/100 g
Clorofila	2106 mg/100 g	2106 mg/100 g	2106 mg/100 g
Valor energético	365 kcal	407 kcal	387 kcal

3.2.2 Efeito da temperatura e concentração na cor de soluções de Chlorella vulgaris

Tal como mencionado anteriormente, com o objetivo de antecipar o comportamento da microalga em produtos finais procedeu-se, então, à realização de ensaios considerados preliminares nos quais se avaliaram diversos fatores, nomeadamente o efeito da concentração da microalga e da temperatura de processamento na cor final dos produtos. Com este propósito, foram elaboradas diversas soluções açucaradas (10% ou 10 g) com diferentes concentrações de *Chlorella vulgaris* às quais foram aplicados diferentes binómios de tempo e temperatura de pasteurização. As percentagens de cada uma das variáveis são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Soluções de *Chlorella vulgaris*, respetivas percentagens de água e açúcar e binómios aplicados

Soluções	<i>Chlorella vulgaris</i> (g)	Binómio (temperatura/tempo) aplicado
Solução 1	1,5	Temperatura ambiente
Solução 2	1,5	85°C, 10 minutos
Solução 3	1,5	90°C, 5 minutos
Solução 4	1,5	95°C, 5 minutos
Solução 5	1,0	Temperatura ambiente
Solução 6	1,0	85°C, 10 minutos
Solução 7	1,0	90°C, 5 minutos
Solução 8	1,0	95°C, 5 minutos
Solução 9	0,5	Temperatura ambiente
Solução 10	0,5	85°C, 10 minutos
Solução 11	0,5	90°C, 5 minutos
Solução 12	0,5	95°C, 5 minutos
Solução 13	1,5 (sem açúcar)	85°C, 10 minutos
Solução 14	1,5 (sem açúcar)	90°C, 5 minutos
Solução 15	1,5 (sem açúcar)	95°C, 5 minutos

A quantidade da microalga correspondente a cada uma das soluções foi pesada e colocada em copos com tampa, procedendo-se de seguida à pesagem e adição do açúcar e por fim da água (para perfazer 100 mL). No final da pesagem, e da consequente incorporação de todos os elementos, cada uma das soluções foi devidamente homogeneizada até se ter verificado uma completa dissolução das mesmas. Após a preparação e homogeneização, estas foram submetidas a diferentes binómios de tempo/temperatura, com exceção da solução 1 à qual não foi aplicado qualquer tratamento térmico, tendo sido utilizada como amostra controlo. Imediatamente após a pasteurização e arrefecimento à temperatura ambiente, foi realizada a medição de cor de cada uma das soluções, tendo sido registados os valores de L*, a*, b* C e h°. Para o registo dos valores de cor, uma parte de cada uma destas soluções foi colocada em recipientes de plástico (brancos) com capacidade para 80 mL e o medidor foi posicionado no centro do copo tendo sido de seguida efetuadas 3 medições consecutivas. A quantidade restante de cada solução foi armazenada à temperatura de refrigeração (4±2 °C). As medições de cor foram repetidas após 48 horas e 120 horas de armazenamento.

3.2.3 Efeito do pH na cor de soluções com *Chlorella vulgaris*

A) Soluções tampão de citrato-fosfato com *Chlorella vulgaris*

Com o objetivo de avaliar o comportamento da microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes valores de pH e estudar a estabilidade da cor desta quando aplicada em preparados cujos valores de pH são mais baixos (próximos de 4) foram preparadas diversas soluções tampão utilizando hidrogenofosfato de sódio (0,2 M; grau de pureza: 98,5-100%; Sigma Aldrich, Espanha) e ácido cítrico (0,1 M, grau de pureza:100%; Yixing-Union Biochemical CO., LTD (China)). As quantidades de cada um destes compostos encontram-se descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Compostos e quantidades utilizadas na preparação das soluções tampão e respetivo pH final

Soluções	Hidrogenofosfato de Sódio (g)	Ácido cítrico (g)	Água (g)	pH final
Solução 1	10,2	39,8	50,0	2,77
Solução 2	15,9	34,1	50,0	3,23
Solução 3	20,6	29,4	50,0	3,70
Solução 4	24,5	25,5	50,0	4,19
Solução 5	25,7	24,3	50,0	4,31
Solução 6	27,8	22,2	50,0	4,55
Solução 7	32,1	17,9	50,0	5,46

As quantidades de hidrogenofosfato e ácido cítrico foram colocadas em recipientes de plástico com tampa e foi adicionada água até perfazer o volume de 100 mL. Após a adição destes componentes procedeu-se à sua mistura até se verificar a completa dissolução. Foram de seguida, confirmados os valores de pH de cada uma das sete soluções. Após a confirmação de cada um dos valores de pH, foi adicionada a cada uma destas soluções 0.18 g (0.18%) de *Chlorella vulgaris* em pó e procedeu-se novamente à homogeneização de cada uma delas para evitar a deposição da microalga no fundo do copo. Após a preparação das soluções foi realizada a medição de cor tendo sido registados os valores das coordenadas L*, a*, b* C e h°.

Para o registo dos valores de cor, uma parte de cada uma destas soluções foi colocada em recipientes de plástico (brancos) com capacidade para 80 mL e o medidor foi posicionado no centro do copo tendo sido de seguida efetuadas 4 medições consecutivas. A quantidade restante de cada uma das soluções foi colocada em tubos de falcon com capacidade para 50 mL e reservada à temperatura ambiente. Após 24 horas foi efetuada uma nova medição de cor e registados os valores, procedendo-se de seguida à colocação de cada tubo num banho aquecido e aplicado o binómio 95 °C, 10 minutos. Após aplicação do binómio as soluções foram deixadas à temperatura ambiente até arrefecerem, efetuando-se de seguida nova medição de cor.

B) Soluções acidificadas de *Spirulina* spp.

Com o objetivo de avaliar o comportamento da microalga *Spirulina* spp. a diferentes valores de pH e estudar a possibilidade da adição desta para auxiliar na manutenção da cor verde de soluções com *Chlorella vulgaris* foram preparadas 3 soluções com diferentes valores de pH (tabela 6). Estas soluções foram preparadas com água e concentrado de sumo de limão (46 °Brix). Neste caso foi escolhido o concentrado de sumo de limão para regular a acidez de modo a simular as condições de um preparado de fruta.

Tabela 6 - Compostos e quantidades utilizadas na preparação das soluções acidificadas com *Spirulina* spp. e respetivo pH final

Soluções	Sumo de limão (g)	Quantidade de <i>Spirulina</i> spp. (g)	Quantidade de água (mL)	pH final
Solução 1	--	0,10	100,00	9,08
Solução 2	0,12	0,10	99,88	4,64
Solução 3	0,44	0,10	99,56	3,44

A quantidade de concentrado de sumo de limão pesada para cada uma das soluções foi colocada em recipientes de plástico e adicionada água até perfazer o volume de 100 mL. No caso da solução controlo, cujo pH final é de 9,08, não foi adicionado sumo de limão, mas apenas 100 mL de água. Após a adição de água procedeu-se à mistura da solução até se verificar a dissolução completa. Foram de seguida, confirmados os valores de pH de cada uma das soluções.

Após a confirmação desses valores, foi adicionada a cada uma das soluções 0,10 g (0,10%) de *Spirulina* em pó e procedeu-se novamente à homogeneização de cada uma delas para evitar a deposição da microalga no fundo do copo. Após a preparação das soluções foi realizada a medição de cor de cada uma delas. Para o registo dos valores de cor, uma parte de cada uma destas soluções foi colocada em recipientes de plástico (brancos) com capacidade para 80 mL e o medidor foi posicionado no centro do copo tendo sido de seguida efetuadas 2 medições consecutivas e registados os valores das coordenadas L*, a*, b* C e h°. De seguida, as soluções restantes foram colocadas num banho aquecido e sujeitas ao binómio 80 °C, 5 minutos. Após aplicação do binómio as soluções foram deixadas à temperatura ambiente (18±2 °C) até arrefecerem, efetuando-se de seguida nova medição de cor.

C) Soluções acidificadas de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

Com o objetivo de avaliar o comportamento da cianobactéria *Spirulina* spp. e da microalga *Chlorella vulgaris*, em combinação, foram preparadas 3 soluções destas, de respetivamente, 0,1% e 0,2% em sumo de limão e água tendo-se obtido diferentes valores de pH (tabela 8). O sumo de limão foi escolhido como regulador de acidez, para em simultâneo se simularem as condições de um preparado de fruta. As quantidades de cada um dos compostos encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Quantidades de sumo de limão, *Spirulina* spp. e *Chlorella vulgaris* usadas na preparação das soluções

Soluções	Sumo de limão (g)	<i>Spirulina</i> spp. (g)	<i>Chlorella vulgaris</i> (g)	Água (g)	pH final
Solução 1	--	0,10	0,20	100,00	8,84
Solução 2	0,18	0,10	0,20	99,82	4,58
Solução 3	0,22	0,10	0,20	99,78	4,32

A quantidade de sumo de limão pesada para cada uma das soluções foi colocada em copos de plástico aos quais foi adicionada água até perfazer o volume de 100 g. No caso da solução controlo (pH final é 8,84), não foi adicionado sumo de limão. Após a adição do sumo de limão e da água procedeu-se à mistura da solução até homogeneização completa das mesmas. Foram, de seguida, confirmados os valores de pH de cada uma das soluções.

Seguidamente, foi adicionada a cada uma destas soluções 0,10 g (0,10%) de *Spirulina spp.* e *Chlorella vulgaris* 0,20 g (0,2%) em pó e procedeu-se novamente à homogeneização de cada uma para evitar a deposição no fundo do copo. Após a preparação das soluções foi realizada a medição de cor de cada uma delas tendo sido registados os valores das coordenadas L*, a*, b* C e h°. Para o registo dos valores de cor, uma parte de cada uma destas soluções foi colocada em copos de plástico (brancos) com capacidade para 80 mL e o medidor foi posicionado no centro do copo tendo sido de seguida efetuadas 4 medições consecutivas. A restante solução (que não foi utilizada na medição de cor), foi mantida nos copos, sendo colocadas posteriormente num banho aquecido e aplicado o binómio 80 °C, 5 minutos. Após a aplicação do tratamento térmico, foi necessário deixar as amostras arrefecer até à temperatura ambiente (18±2 °C) e efetuou-se uma nova medição de cor.

D) “Preparado” de *Chlorella vulgaris*

Nesta fase do procedimento experimental, pretendeu-se estudar o comportamento da microalga quando adicionada a uma solução composta (mais de dois ingredientes). Tal como nos tópicos anteriores, foi avaliada a influência do pH na cor. Para tal, elaboraram-se cerca de 2 quilogramas de um preparado cuja composição era 69,52% de água; 28% de açúcar; 1,2% de cloreto de cálcio; 1,0% de uma mistura de hidrocolóides; 0,18% de microalga, 0,10% de sorbato. Os ingredientes foram pesados e adicionou-se de seguida *Chlorella vulgaris* à mistura dos mesmos até à completa homogeneização. O preparado foi depois dividido por 12 frascos, nos quais foi adicionado, uma quantidade de ácido cítrico obtendo-se diferentes valores de pH. Assim prepararam-se amostras com seis valores de pH 6,95; 5,67; 4,21; 3,24 e 2,67 sendo cada uma destas preparada em duplicado. As amostras originais foram reservadas e posteriormente foi realizada a medição de cor de cada uma delas. As réplicas foram colocadas num banho aquecido e aplicado o binómio 95 °C, 5 minutos. Após a aplicação do tratamento térmico, foi necessário deixar as amostras arrefecer até à temperatura ambiente (18±2 °C) e proceder, de seguida à medição de cor. Para a medição de cor de todas as amostras foi retirada uma porção de cada um dos frascos e colocada em copos brancos (plástico) com capacidade para 80 mL. O medidor foi posicionado no centro do copo e registadas 4 medições de cor consecutivas. Foram medidos os valores de L*, a*, b* C e h°.

3.2.4 Efeito do processamento térmico na carga microbiológica – definição de binómios tempo/temperatura de processamento

Este ponto do procedimento experimental foi importante na determinação do binómio (tempo/temperatura) capaz não só de diminuir a carga microbiológica inicial (de modo a garantir a segurança alimentar), mas também preservar as características finais dos produtos desenvolvidos. Na tabela 8 encontra-se a caracterização microbiológica (cedida pelo fornecedor) das amostras de *Chlorella vulgaris* provenientes dos 3 lotes utilizados.

Tabela 8 - Caracterização microbiológica das amostras de *Chlorella vulgaris* dos 3 lotes utilizados (informações constantes do boletim analítico cedido pelo fornecedor)

Contagens	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Microrganismos totais	$6,7 \times 10^7$ ufc/g	$6,0 \times 10^3$ ufc/g	$4,0 \times 10^1$ ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	$< 1,0 \times 10^2$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não detetado/25 g	Não detetado/25 g	Não detetado/25 g
<i>Escherichia Coli</i>	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
<i>Salmonella</i>	Não detetado/25 g	Não detetado/25 g	Não detetado/25 g
<i>Pseudomonas spp.</i>	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
Bolores e Leveduras	$< 1,0 \times 10^3$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g
Coliformes	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	--	--
<i>Vibrio spp.</i>	--	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g	$< 1,0 \times 10^1$ ufc/g

Para confirmação dos valores constantes nos certificados analíticos do fornecedor foram adicionados 10 g da microalga a 90 mL de diluente (MRD) seguida de homogeneização (só para o lote 1). Após verificação da completa dissolução da mesma, iniciaram-se as análises microbiológicas tal como descritas no ponto 3.1.5. Numa segunda fase, a microalga (Lote 1) foi aplicada a 1% em soluções de água, que foram de seguida submetidas aos tratamentos térmicos apresentados na figura 10. Após aplicação destes tratamentos foram retiradas 10 g de cada uma e colocadas em 90 mL de MRD e após homogeneização foram utilizadas para as análises.

O binómio tempo/temperatura determinado foi utilizado nos produtos que continham a microalga proveniente do primeiro lote. Relativamente aos produtos cujas amostras eram provenientes dos lotes 2 e 3, o binómio aplicado foi de 90 °C durante 5 minutos já que se verificou que a carga inicial era mais baixa (figura 10). No caso dos lotes 2 e 3 a carga microbiana constante nos boletins cedidos pelo fornecedor não foi confirmada, já que no caso anterior os valores obtidos nas análises efetuadas em laboratório eram praticamente coincidentes com os dos boletins do fornecedor.

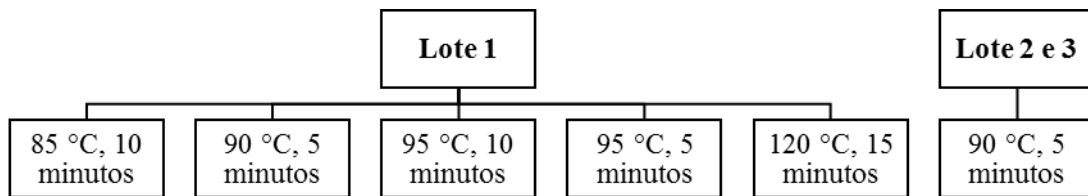


Figura 10 - Esquema dos tratamentos térmicos aplicados às soluções com 1% de *Chlorella vulgaris*

3.2.5 Aplicação da *Chlorella vulgaris* em matrizes alimentares

A) Smoothies (Bebidas de fruta)

As formulações de *smoothies* desenvolvidas resultaram de adaptações de fórmulas anteriormente produzidas na Frulact (tabela 9). As alterações efetuadas tiveram em conta não só a adição da microalga aos preparados, mas também a obtenção de um *smoothie* organoleticamente agradável para o consumidor. A construção das várias versões apresentadas foi realizada de acordo com as opiniões dos colaboradores. Após a prova de cada um dos *smoothies* os colaboradores sugeriam o aumento/diminuição de alguns constituintes ou a substituição de um ingrediente por outro alternativo.

Tabela 9 – Formulações e respetivas percentagens *smoothies* com aplicação de *Chlorella vulgaris*

Matéria-Prima	Versão 1 (%)	Versão 2 (%)	Versão 3 (%)	Versão 4 (%)	Versão 5 (%)	Versão 6 (%)	Versão 7 (%)
Água Fria	0,57	0,75	2,26	0,64	0,18	0,28	27,95
Sumo Ananás*	10,00	10,00	14,99	10,01	16,00	16,00	18,33
PuréFramboesa*	6,00	--	--	--	--	--	--
Sumo Laranja*	47,43	21,25	21,25	21,25	18,75	18,75	18,75
Sumo Maçã*	26,00	--	--	--	--	--	--
Puré de Manga*	8,00	35,00	35,00	35,00	34,00	34,00	--
Polpa de banana	--	16,00	14,00	16,00	14,00	14,00	16,00
Polpa de Maçã	--	15,00	12,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Sumo Maracujá	--	--	--	--	--	--	2,00
Extracto Guaraná	--	--	--	--	--	0,10	0,10
Concentrado vegetal	--	--	--	--	0,20	--	--
Erva trigo	1,00	1,50	--	0,10	--	--	--
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,00	0,50	0,50	2,00	1,87	1,87	1,87

* Sumo e purés reconstituídos a partir de concentrados.

Após a pesagem dos vários constituintes, considerando uma massa total de 500 gramas por *smoothie*, procedeu-se à mistura e correta homogeneização de todos os ingredientes. Devido à grande dificuldade de dispersão em soluções líquidas da microalga, esta era o último ingrediente a ser incorporado na mistura.

Após a dispersão de todos os componentes, cada um dos *smoothies* foi pasteurizado a 95 °C durante 5 minutos (em todas as versões foi utilizado o lote 1) numa placa de indução. Depois da pasteurização foram medidos os valores de pH e Teor de sólidos solúveis (°Brix), procedendo-se de seguida ao arrefecimento até à temperatura ambiente. Os valores de pH e °Brix foram medidos novamente 24 horas depois, sendo que as amostras foram conservadas a 4 °C. No caso dos *smoothies* não se considerou pertinente a medição de viscosidade porque os produtos em questão eram de textura líquida.

B) *Frushapes* (fruta em formas) de banana com *Chlorella vulgaris*

A formulação de *frushape* foi construída tendo por base uma receita já produzida pela Frulact à qual se adicionou a microalga. A incorporação deste ingrediente teve como objetivo a obtenção de um produto final que fosse não só apelativo visualmente para o consumidor, mas que também pudesse acrescentar valor do ponto de vista nutricional. Para a formulação foi utilizada fruta desidratada, mais concretamente a banana já que em ensaios prévios o sabor deste fruto conseguia mascarar com relativo sucesso o sabor a mar conferido pela microalga. A banana desidratada (*Paradies Frucht GMBH*) utilizada possuía granulometria de 0-2 mm e sofria um processo de secagem sendo que 1 kg de banana desidratada é o equivalente a 10 kg de banana fresca. Para a formulação a banana desidratada foi incorporada a 46,88%, sêmola de trigo duro a 37,86%, água fria a 13,30%, *Chlorella vulgaris* a 1,87% e aroma de banana a 0,09%. O procedimento para elaboração das massas encontra-se descrito na figura 11.

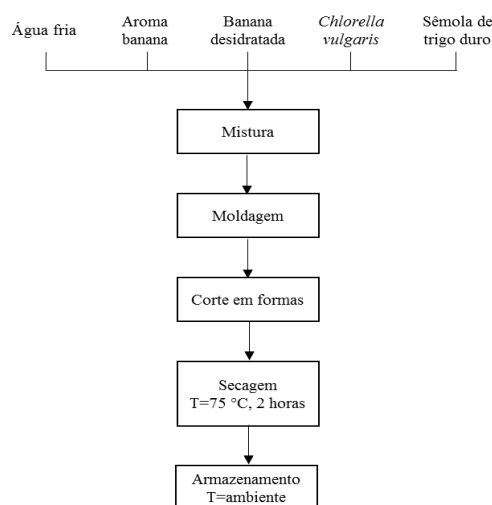


Figura 11 - Fluxograma de produção de *frushapes* de banana e *Chlorella vulgaris* à esquerda e formas de corte à direita

Os componentes secos foram pesados nas percentagens acima mencionadas, tendo em conta a obtenção de uma massa final de produto de 500 gramas. Após uma pré-mistura dos ingredientes secos foram adicionados, aos poucos, os ingredientes líquidos procedendo-se à moldagem manual até à obtenção de uma massa mais ou menos compacta e homogénea. De seguida, a massa foi esticada até se obterem folhas com cerca de 3 mm de espessura cada uma. Após a obtenção da espessura pretendida a massa foi cortada em formas (corações e estrelas) até se ter esgotado toda a quantidade produzida. As formas foram de seguida colocadas numa estufa a 75 °C durante duas horas. Depois de secas foram deixadas a arrefecer até à temperatura ambiente e reservadas no exsiccador com sílica gel até ao momento de utilização. Da massa total resultante do processamento, uma pequena parte foi adicionada posteriormente a um preparado cuja composição se encontra descrita na tabela 10. Esta incorporação facilita não só a aplicação em produtos finais (iogurtes, gelados), mas também pretende enriquecer nutricionalmente o produto a apresentar ao consumidor.

Tabela 10 - Componentes e respetivas percentagens utilizadas para formulação do “preparado” para incorporação de *frushapes*

Matéria-Prima	% na formulação
Água fria	32,27
Sumo banana*	45,15
Açúcar	12,00
<i>Frushape</i> banana e <i>Chlorella vulgaris</i>	7,00
Amido modificado milho	2,50
Carragenina	0,25
Ácido cítrico	0,15
Sorbato potássio granulado	0,13
Sumo limão*	0,53
Aroma banana	0,02

* Sumos reconstituídos a partir de concentrados.

A partir das percentagens enunciadas na tabela anterior foram elaborados 500 g de produto final. Após a pesagem de todos os ingredientes, procedeu-se à mistura da água (uma pequena parte), do sumo de banana, do açúcar e do sumo de limão. A água restante foi utilizada para dissolver previamente o ácido cítrico, o amido, o sorbato de potássio e a carragenina.

Os ingredientes depois de devidamente hidratados foram colocados numa panela de indução e aplicado o binómio 90 °C, 4 minutos (foi utilizado o lote 2). Quando o preparado atingiu os 85 °C foram adicionados os *frushapes*, de modo a preservar a sua integridade durante o tratamento térmico, isto porque com a hidratação e agitação constante podem acabar por perder a sua forma original. O aroma foi adicionado após o tempo de *holding*, para evitar a rápida volatilização do mesmo, por ação do calor. Após arrefecimento do preparado até à temperatura ambiente, o mesmo foi dividido em oito copos de plástico e fechados e conservados a 4 °C para as análises posteriores. Relativamente às análises físico-químicas, no caso dos *frushapes* na sua forma seca foi apenas realizada a medição de cor, pois como se encontram no estado sólido a medição dos parâmetros de pH, °Brix e viscosidade não é possível determinar. Esta análise foi elaborada durante sete semanas (uma amostragem por semana) e foram registados os valores de L*, a*, b*, C e h°. Para o registo dos valores pesaram-se cerca de 35 g de *frushapes* que foram triturados num moinho DeLonghi e o pó resultante foi colocado num acessório especial para este tipo de produtos. O acessório com a amostra foi devidamente acoplado ao colorímetro e realizadas 4 medições sucessivas. Por outro lado, foi possível analisar parâmetros de cor, pH, °Brix e viscosidade do preparado ao longo de sete semanas de armazenamento.

C) “Preparado salgado” com *Chlorella vulgaris*

Com a ajuda da análise preliminar elaborada foi possível concluir que as bases açucaradas dificilmente mascaravam o sabor a mar conferido pela microalga. Deste modo, foi necessário procurar bases alternativas para aplicação da microalga, que fossem interessantes do ponto de vista organolético. Com este objetivo foi criada uma formulação, que conta com a adição de especiarias que ajudam a disfarçar o sabor a mar da microalga. Os ingredientes e as percentagens correspondentes encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 - Ingredientes e respetiva percentagem do “preparado salgado” com *Chlorella vulgaris*

Matéria-Prima	% na formulação
Água fria	64,60
Cebola tostada em pó	11,40
Alho granulado	11,40
Sal higienizado	6,13
Açúcar	2,80
Aneto	2,40
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,40
Manteiga com sal	0,31
Amido modificado de milho	0,20
Goma guar	0,16
Glutamato monossódico	0,10
Sorbato potássio granulado	0,10

A pesagem dos ingredientes foi elaborada tendo em conta a obtenção da massa final de 500 g de preparado. Depois de devidamente pesados foram colocados num recipiente a parte da água disponível, a cebola, o alho, o aneto a microalga e a manteiga. Os ingredientes restantes foram previamente hidratados em água e posteriormente adicionados à primeira mistura. Depois de devidamente incorporados todos os ingredientes, a mistura foi colocada numa panela e com o auxílio de placa de indução foi aplicado o binómio 90 °C, 4 minutos (a amostra de *Chlorella* utilizada neste trabalho provém do lote 2). Após o tempo de *holding* foram registados os valores de pH e °Brix e o preparado foi arrefecido com agitação constante até à temperatura ambiente, tendo sido posteriormente dividido por oito copos de plástico que foram fechados e armazenados em ambiente refrigerado (4 °C) até análises posteriores. Como o objetivo deste preparado era a sua incorporação numa base de queijo tipo “Philadelphia”, as análises físico-químicas (pH e °Brix) foram efetuadas ao preparado simples e ao preparado aplicado em queijo (preparado dosificado a 12%, no qual se misturam por exemplo 12 g de preparado e perfaz-se com queijo até 100 g) ao longo de 8 semanas.

D) Preparado “mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

Ao longo do trabalho prático e de acordo com as sugestões feitas pelas pessoas que estavam diretamente relacionadas com o projeto foi possível verificar que as bases salgadas funcionam melhor para incorporação da microalga. Devido à grande aceitabilidade demonstrada pela base salgada acrescentaram-se depois legumes de modo a enriquece-la do ponto de vista nutricional. A formulação e respetivas percentagens encontram-se descritas na tabela 12.

Tabela 12 - Formulação e respetivas percentagens do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

Matéria-Prima	% na formulação
Água fria	26,04
Abobrinha cortada a 6 mm	16,50
Pimentos (3 cores) cortados a 6 mm	15,00
Puré de tomate*	10,60
<i>Chlorella vulgaris</i>	10,00
Azeitona cortada rodelas de 6 mm	5,00
Beringela cortada a 6 mm	5,00
Cebola cortada a 6 mm	4,00
Açúcar	3,00
Sal	1,50
Ácido cítrico	1,23
Amido modificado de milho	0,60
Pimenta em pó	0,50
Salsa desidratada	0,40
Alho granulado	0,40
Sorbato de potássio granulado	0,13
Pectina LMA	0,10

*Puré reconstituído a partir de concentrado.

A pesagem dos ingredientes foi elaborada tendo em conta a massa final de 1500 g de preparado. Depois de devidamente pesados, todos os legumes foram colocados num recipiente que continha a pequena parte da água disponível, o puré de tomate, a pimenta, a salsa e o alho. O açúcar, o sal, o ácido cítrico, o amido e o sorbato foram previamente dispersos em água e depois adicionados à mistura anterior. A água restante foi aquecida (40 °C), na qual foi dispersa a pectina. A primeira mistura foi também aquecida até 40 °C após o que foi adicionada a solução de água e pectina. Depois de devidamente homogeneizado foi aplicado ao preparado o binómio 90 °C, 4 minutos e após o tempo de holding foram medidos os valores de pH, °Brix, viscosidade e L*, a*, b*, C, h°. Após a medição dos parâmetros físico-químicos o preparado foi arrefecido com agitação constante até atingir a temperatura ambiente, e foi retirada uma parte deste preparado para testes de aceitabilidade ao consumidor e outra parte foi dividida em 4 copos com tampa e armazenada a 4 °C para análises posteriores.

Após arrefecimento de parte do preparado, este foi dosificado a 30% em queijo “Philadelphia” e foram realizados os testes de aceitabilidade tal como descrito no ponto 3.1.5. A determinação dos parâmetros físico-químicos foi realizada uma vez por semana ao longo de 28 dias.

E) *Power bubble* com *Chlorella vulgaris*

Ao longo do trabalho prático e de acordo com as sugestões feitas por outras pessoas envolvidas no projeto foi ainda possível elaborar um “preparado”, tendo em vista a sua encapsulação em esferas de alginato. Composições da solução de gotejamento e do “preparado” de *power bubble* estão ilustradas nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Formulação e respetivas percentagens da solução de gotejamento (solução de alginato + pectina)

Matéria-Prima	Solução de gotejamento (%)
Água fria	74,65
Açúcar	24,00
Alginato	0,60
Pectina	0,75

Tabela 14 - Formulação e respetivas percentagens do “preparado” de *power bubble* com *Chlorella vulgaris*

Matéria-Prima	Preparado (%)
Água fria	68,59
Açúcar	28,00
Cálcio	1,20
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,00
Hidrocolóides	1,00
Sorbato de Potássio granulado	0,10
Aroma menta	0,04
Aroma ananás	0,07

A pesagem dos ingredientes foi elaborada tendo em conta a massa final de 1500 g de preparado. Depois de devidamente pesados, foi necessário proceder a uma pré-homogeneização de algumas matérias-primas tendo sido adicionado parte do açúcar da formulação aos hidrocolóides, para facilitar a sua correta dispersão. De seguida, o regulador de acidez, o corante e o cálcio foram dissolvidos utilizando uma pequena parte da água da formulação. A água restante foi utilizada para dispersar devidamente os hidrocolóides. No final todos os ingredientes foram misturados e colocados numa panela de indução procedendo-se de seguida à pasteurização do “preparado”.

Os aromas foram adicionados pouco antes do início do *holding*, de modo a evitar a evaporação dos mesmos. Depois de devidamente homogêneo foi aplicado ao preparado o binómio 90 °C, 3 minutos e após o tempo de *holding* foram medidos os valores de pH, °Brix, viscosidade. Após a medição dos parâmetros físico-químicos o preparado foi reservado. No que diz respeito à solução de gotejamento, o açúcar foi adicionado com às gomas e a mistura foi dispersa em água.

Durante o gotejamento das esferas foi utilizada uma placa com agitação magnética para que as esferas não se depositem no fundo nem se unam umas as outras. Após gotejamento e formação das esferas estas foram lavadas com água corrente e realizados os testes de aceitabilidade tal como descrito no ponto 3.1.5. A determinação dos parâmetros físico-químicos foi realizada uma vez por semana ao longo de 28 dias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados obtidos ao longo do procedimento experimental. Na primeira parte apresentam-se os resultados relativos ao comportamento da microalga em estudo face a diversos fatores, nomeadamente o pH, a temperatura e concentração. Na segunda parte estão descritos os resultados referentes às aplicações da microalga em matrizes alimentares, bem como as discussões sobre cada uma destas aplicações.

4.1 Efeito da temperatura e concentração na cor de soluções com *Chlorella vulgaris*

De modo a avaliar o efeito da concentração e da temperatura no comportamento da microalga *Chlorella vulgaris* em termos de variação dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h°). Foram realizadas diferentes soluções (concentrações de 0,5%; 1% e 1,5%), que posteriormente foram sujeitas a diferentes binómios de tempo/temperatura. Foram registados os valores dos parâmetros de cor. Os dados foram analisados recorrendo a uma análise de componentes principais (ACP) (figura 12).

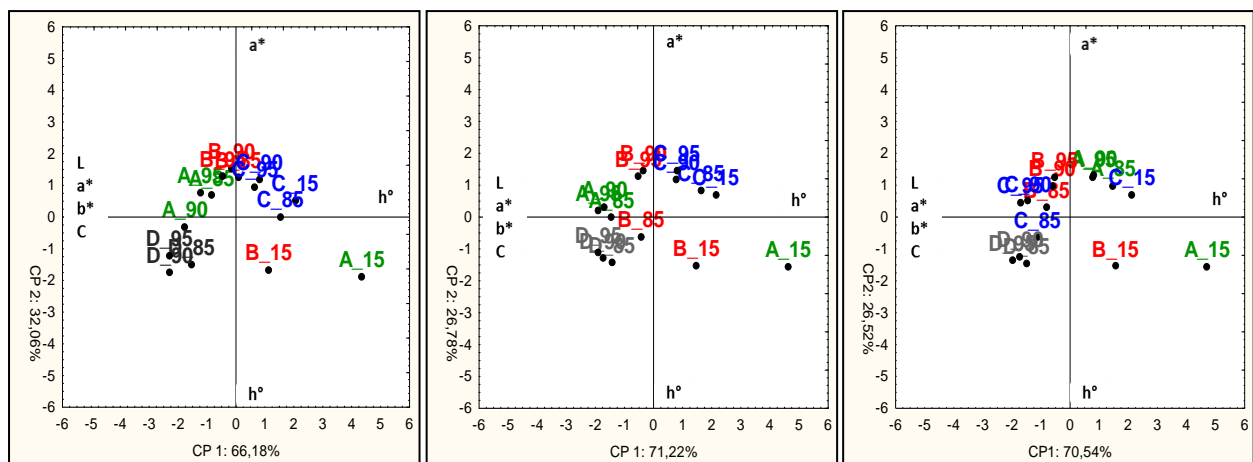


Figura 12 - Análise de componentes principais (dia 0 à esquerda, dia 2 ao centro e dia 5 à direita). A codificação utilizada para simplificação da representação gráfica foi: A-Soluções de 1,5% microalga, B-Soluções de 1,0%, C-Soluções de 0,5% e D-Soluções de 1,5% sem açúcar e os números que procedem as letras correspondem à temperatura aplicada a cada solução

Observando os *outputs* da ACP apresentados na figura 12, soluções com maior concentração (D) e com aplicação de binómios tempo/temperatura mais agressivos tendem a acastanhar. Quando comparados os 3 tempos de análise, com exceção do dia 5 em que se verificou que as soluções com 1,5% e 0,5% contariam a tendência anterior. Relativamente ao dia 0 a análise de componentes principais resume cerca de 98% da informação inicial em apenas duas componentes principais. A CP 1 que resume cerca de 66% dos dados, no eixo horizontal, mostra as variações de L^* , a^* , b^* e C que aumentam no sentido negativo do eixo. A tonalidade também é representada nesta componente, que por sua vez aumenta no sentido positivo do eixo.

Na CP 2, que explica cerca de 32% da informação no eixo vertical, observam-se as variações em relação aos parâmetros a^* no sentido positivo e h^o no sentido negativo deste eixo. Da análise de correlação destes 2 parâmetros (a^* e h^o) verifica-se que algumas amostras se diferenciam das restantes, isto porque os parâmetros são projetados no quadrante superior esquerdo (as diferenças são influenciadas pelo valor de a^* mais elevado) e no quadrante inferior direito (as diferenças são influenciadas pelo valor de h mais elevado). Analisando a componente principal 1, verificamos que os valores de L^* , a^* , b^* e C aumentam com o aumento da concentração de *Chlorella vulgaris*, ou seja, as amostras com 1,5%, 1% e 1,5% sem açúcar afastam-se das amostras com 0,5%, sendo que as amostras com 1,5% da microalga (com e sem açúcar) são aquelas que possuem os valores mais elevados. Pode ainda dizer-se que a adição de açúcar não influencia a cor final das soluções já que para as amostras de 1,5%, com e sem açúcar, os valores dos parâmetros analisados são muito próximos. O facto de terem sido aplicados diferentes binómios parece não ter sido o fator determinante na mudança de cor das soluções, ou seja, a severidade do tratamento por si só não determina a mudança de cor, já que as soluções em que se aplicou o binómio 85 °C, 10 minutos não se afastam muito das soluções em que se aplicou o binómio 95 °C, 5 minutos, levando a concluir que a partir de uma determinada temperatura a cor será degradada.

Relativamente aos valores de h^o verificados nesta componente pôde observar-se que quanto maior a temperatura e a concentração da solução, mais baixos foram os valores deste. A única amostra que não segue comportamento semelhante é a A_15 (0,5% *Chlorella* sem aplicação de temperatura) que parece ter mantido a cor verde (tendo obtido valores de h^o mais elevados) quando comparada com as restantes.

Relativamente à CP2, confirma-se o observado anteriormente, em que as amostras A_15 e B_15 apresentam uma tonalidade mais próxima do verde (escuro, sentido oposto à posição dos valores de L^* mais elevados). A análise projeta estas duas amostras no quadrante inferior direito do gráfico. Para além disso, é possível verificar ao analisar as soluções onde não existe aplicação de temperatura que o valor do parâmetro a^* aumenta com o aumento da concentração de microalga em solução.

Na prática o aumento do valor de L^* nas amostras mais concentradas traduz-se em soluções mais claras, por outro lado os valores de a^* obtidos significam que as soluções perdem a sua cor verde característica deslocando-se no sentido de uma cor mais vermelha. O aumento do valor de b^* ajuda também a explicar o acastanhamento que se verifica, isto porque a cor tende a aproximar-se mais do amarelo (conjugação de amarelo e vermelho - acastanhamento ver figura 13). Quando analisamos o valor de ângulo obtido (Apêndice II – tabelas 20, 22 e 23) nas diferentes soluções, podemos concluir que quando falamos das amostras cuja concentração é 0,5% e não existe aplicação de temperatura a tonalidade adquire valores próximo de 120° , ou seja, as amostras situam-se no quadrante que contempla o ângulo de 90° (amarelo) e o ângulo de 135° (amarelo esverdeado), pelo contrário as amostras que sofrem processamento térmico e cuja concentração é mais elevada, adquirem valores abaixo dos 90° , caindo para o quadrante que contempla o ângulo de 45° (vermelho) e se desloca até ao ângulo de 90° (amarelo).

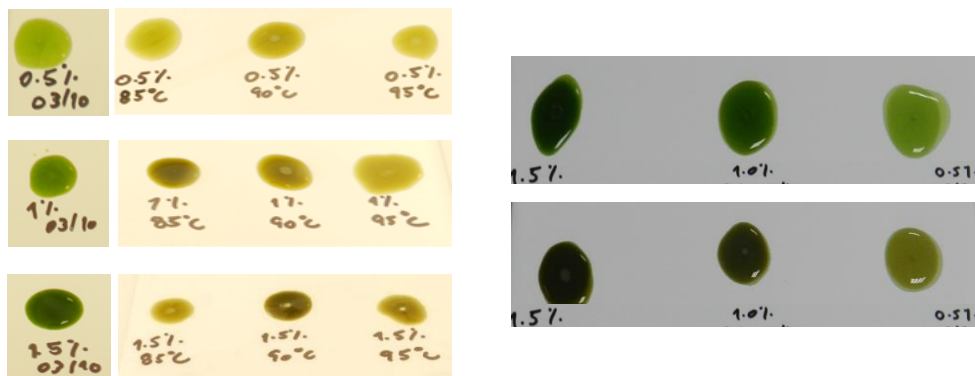


Figura 13 - Influência da cor na pasteurização (soluções açucaradas à esquerda, à direita soluções de *Chlorella vulgaris* sem açúcar). As imagens referem-se ao primeiro dia de amostragem.

Quando analisamos as soluções ao terceiro dia de amostragem podemos concluir que o seu comportamento é muito semelhante ao anterior, ou seja, observa-se um acastanhamento com o aumento da temperatura e da concentração da microalga em solução. Tal como no caso anterior, as amostras A_15 e B_15 destacam-se em relação às restantes. Analisando a componente principal 1 (onde está descrita cerca de 71% da informação inicial) verificamos que a amostra A_15 obtém valores mais baixos para aos parâmetros L^* , a^* , b^* e C e valores mais elevados para o parâmetro h° , o que se traduz na manutenção da cor verde, ao contrário das restantes em que se verifica o acastanhamento das mesmas. Através da CP 2 (em que estão descritos cerca de 27% dos dados iniciais) verificamos que as amostras A_15 e B_15 apresentam uma tonalidade mais próxima do verde. Através da análise de componentes principais, pode ainda verificar-se que as amostras ao longo do tempo tendem a agrupar-se de acordo com a sua concentração, o que pode querer dizer que a microalga em solução tende a perder a sua cor característica ao longo do tempo no caso de ter sofrido tratamento térmico prévio.

No quinto dia de amostragem verificamos que mais uma vez as amostras A_15 e B_15 se destacam em relação às restantes. De facto apenas estas amostras mantiveram o seu comportamento inalterado ao longo dos dias, ou seja só estas soluções mantiveram a cor verde ao longo do tempo de análise. Através da componente principal 1 (onde estão presentes cerca de 70% dos dados iniciais), verificamos que as soluções com concentração de 0,5% adquirem neste dia valores mais elevados de L^* , a^* , b^* , C e h° , o que corrobora a teoria de que a microalga em solução aquosa e sujeita a tratamento térmico tende a perder cor ao longo do tempo. Por outro lado, através da análise da componente principal 2 verificamos que as soluções com 1,5% de microalga em solução e sem adição de açúcar, adquirem valores mais elevados relativamente ao parâmetro a^* fazendo com que a cor destas se aproxime da cor amarela. Apesar de visualmente terem sido verificadas notórias diferenças entre os grupos, foi necessário comprovar estatisticamente se essas diferenças são significativas. Com este intuito realizou-se um teste ANOVA-fator único para cada um dos dias de amostragem e para cada parâmetro em estudo, de modo a comprovar a influência da temperatura e concentração nas diversas amostras. De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar que estatisticamente existem diferenças significativas em cada um dos parâmetros nos diferentes dias de amostragem porque em todos os casos o valor de p é menor que 0,05 (Apêndice II – tabela 21).

O acastanhamento verificado nas várias soluções pode ser explicado pela presença e subsequente degradação da clorofila da microalga. Segundo Schwartz e Lorenzo (1990), que estudaram as alterações que ocorrem na clorofila durante o processamento, este pigmento quando sujeito a tratamentos térmicos mais prolongados, degrada-se e forma um composto conhecido por feofitina, responsável por acentuadas alterações de cor. A temperatura provoca não só a degradação das clorofilases como também das enzimas responsáveis pela cor verde, originando produtos de cor verde azeitona. Essa degradação é ainda mais acentuada quando o teor de humidade de um determinado produto é elevado. Também foi estudado que à temperatura ambiente a clorofila é extremamente estável, mas quando a sujeita a temperaturas superiores a 50 °C, perde grande parte dessa estabilidade (Andres-Bello *et al.*, 2013). No caso em estudo verificou-se que não só as soluções com maior concentração (maior quantidade de clorofila) são aquelas em que a mudança de cor é mais acentuada, como também que a aplicação de temperaturas acima dos 85 °C contribui para a alteração de cor. Verificou-se que em solução existe a perda de cor característica, isto porque o aumento de humidade faz com que a degradação da clorofila ocorra mais rapidamente.

Em suma, é possível verificar visualmente (figura 13) e ainda através da análise de componentes principais (figura 12) e da ANOVA (Tabela 21 em apêndice), que tanto a concentração como a temperatura influenciam negativamente a cor das soluções que na sua composição possuam a microalga. Quando aplicadas temperaturas mais elevadas que a temperatura ambiente, parece ter-se verificado a conversão da clorofila (presente na microalga) no composto que confere cor verde azeitona às soluções. Esta degradação parece ser mais acentuada nas soluções com maior concentração e cujos tratamentos térmicos são mais agressivos.

4.2 Efeito do pH na cor de soluções com *Chlorella vulgaris*

De modo a avaliar o efeito do pH no comportamento da microalga *Chlorella vulgaris* foram realizadas diversas soluções, que posteriormente foram sujeitas a pasteurização. Foram registados os valores dos parâmetros de cor em todas as experiências.

A) Soluções tampão de citrato-fosfato com *Chlorella vulgaris*

Os parâmetros de cor registados foram utilizados na construção de uma análise de componentes principais. Com esta análise pretendeu-se avaliar a influência do pH na cor de soluções e verificar se existem diferenças.

A figura 14 representa a análise de componentes principais de soluções com *Chlorella vulgaris* a diferentes valores de pH. Através da análise da figura é possível concluir que determinados valores de pH (valores de pH mais baixos) têm grande influência na cor final das soluções, resultando na separação de alguma delas.

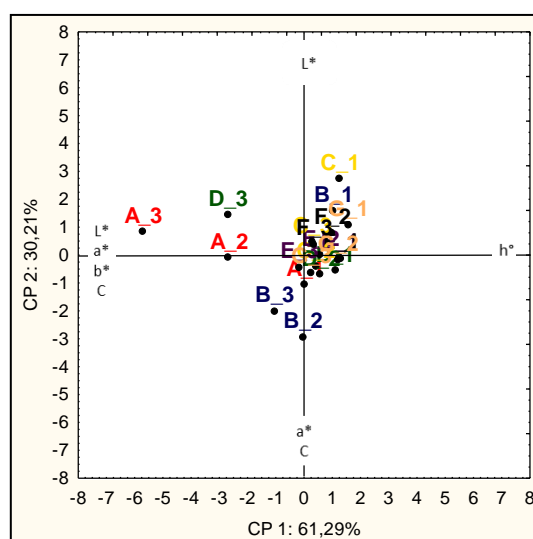


Figura 14 - Análise de componentes principais para as soluções tampão de citrato-fosfato com *Chlorella vulgaris*. A codificação utilizada foi: A-Amostras pH=2,77; B-Amostras pH=3,23; C-Amostras pH=3,70; D-Amostras pH=4,19; E-Amostras pH=4,31; F-Amostras pH=4,55; G-Amostras pH=5,46. Os números que procedem as letras correspondem a: 1-Soluções após preparação; 2-Soluções após 24 horas e 3-Soluções após 24 horas e posterior pasteurização.

Através da análise estatística verificou-se que as amostras são diferentes entre si e em cada um dos parâmetros avaliados ($p < 0,05$) (Apêndice III – tabela 27). Relativamente à análise de componentes principais esta resume cerca de 92% da informação inicial em dois eixos. No eixo horizontal, que representa a CP 1, estão apresentados 61% dos dados iniciais. Esta componente reproduz as variações dos parâmetros L^* , a^* , b^* e C que aumentam no sentido negativo do eixo. Por outro lado no sentido positivo deste eixo estão também representadas as variações da tonalidade das amostras. Na CP 2, onde vemos representados cerca de 30% dos dados iniciais (no eixo vertical do gráfico), observam-se as alterações dos parâmetros a^* e C no sentido negativo da componente e a luminosidade que aumenta no sentido positivo do eixo. Através da observação da componente principal 1 verificamos que a amostra A_3 (pH=2,77 após 24 horas e pasteurização) se destaca, isto porque os valores de L^* , a^* , b^* e C obtidos são mais elevados quando comparados com as restantes amostras. Foram encontradas diferenças significativas entre as amostras em relação a todos os parâmetros com exceção do parâmetro a^* que não distingue a amostra A_3 apenas não é diferente das amostras B_2 e B_3 ($p > 0,05$) (tabela 15).

Tabela 15 - Valores de p obtidos a partir do teste de Tukey que compara a amostra A_3 com as restantes amostras

	B_2	B_3	Restantes amostras
L* (A_3)	0,000162	0,000162	0,000162
a* (A_3)	0,350139	0,997537	0,000162
b* (A_3)	0,000162	0,000162	0,000162
C (A_3)	0,000162	0,000162	0,000162

Também nas soluções A_2 (pH=2,77 e após 24 horas) e D_3 (pH=4,19 após 24 horas e pasteurização) é possível verificar algum afastamento em relação a outras (menos intenso que na amostra A_3). O aumento do valor de L^* a valores de pH mais baixo e com aplicação de temperatura, resulta em soluções mais claras (os valores de L^* deslocam-se no sentido da cor branca). Também o aumento dos valores de a^* e b^* que se regista, explica a perda de cor característica, no caso do parâmetro a^* as soluções tendem a aproximar-se da cor vermelha e no caso do parâmetro b^* da cor amarela, resultando da conjugação destas duas cores o acastanhamento.

Relativamente ao parâmetro h° pode dizer-se que os valores mais baixos são registados, novamente pelas amostras A_2, A_3 e D_3. As restantes amostras obtêm valores de tonalidade mais elevados (que se traduz na manutenção da cor verde) e verifica-se uma aproximação das mesmas. Quando analisamos o valor do ângulo obtido (ver Apêndice III tabelas 25, 26 e 27) nas soluções que parecem ser diferentes verificamos que nestas 3 situações o valor deste parâmetro situa-se abaixo de 37° , o que faz com que estas soluções se aproximem do ângulo de 45° que corresponde à cor vermelha.

Na componente principal 2 verifica-se, que as amostras B_2 (pH=3,23 e após 24 horas) e B_3 (pH=3,23 após 24 horas e posterior pasteurização) se diferenciam de todas as outras, isto porque adquirem valores mais elevados para os parâmetros a^* e C. Estatisticamente pode verificar-se através do teste de Tukey-HSD (figura 39), quando analisado o parâmetro a^* , que as amostras B_2 e B_3 não apresentam diferenças significativas quando comparadas com as amostras A_2 e A_3. Relativamente ao parâmetro C a não existência de diferenças apenas se verifica quando comparada a amostra B_2 com B_3 e vice-versa. O aumento do valor de a^* significa que nestas soluções a cor tende a aproximar-se mais do vermelho, verificando-se também para estas o acastanhamento.

Da análise deste eixo é ainda possível verificar que a amostra C_1 (pH=3,70 após preparação) se distancia (ainda que muito pouco) das restantes, adquirindo valores mais elevados para o parâmetro luminosidade, resultando numa solução mais clara. Apesar das diferenças de cor verificadas a diversos valores de pH, após 24 horas da preparação e com aplicação de tratamento térmico, visualmente as soluções tendem a ficar todas acastanhadas independentemente dos fatores a que foram sujeitas (figura 15).

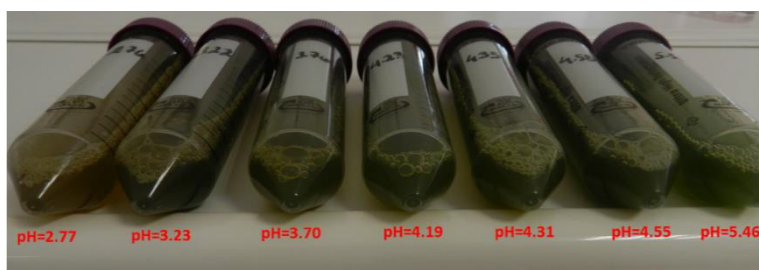


Figura 15 - Soluções tampão de citrato-fosfato com *Chlorella vulgaris* após pasteurização. A imagem corresponde às soluções 24 horas depois com aplicação de pasteurização

A conversão da cor verde característica, que se verifica não só através da análise visual, mas também da análise gráfica e estatística, deve-se não só à aplicação do tratamento térmico mas também ao pH das soluções. As amostras cujos valores de pH são mais próximos da neutralidade mantêm a sua cor verde, mas quando se baixa o pH para valores mais ácidos a mudança de cor é notória. Esta mudança de cor deve-se essencialmente à presença de clorofila em solução e à sua subsequente conversão. De acordo com (Andres-Bello *et al.*, 2013) a maior causa de perda de cor nos vegetais durante o processamento, deve-se à conversão da clorofila em feofitina pela ação do pH (a taxa de degradação da clorofila decresce com o aumento do pH). Durante esta reação os iões de hidrogénio transformam a clorofila em feofitina, através da sua substituição pelo ião de magnésio. No caso em estudo essa conversão parece ter-se verificado, traduzindo-se na alteração da estrutura da microalga e conseqüente mudança de cor. Concluindo, verifica-se que a aplicação de *Chlorella vulgaris* em matrizes alimentares apenas será positiva (em termos visuais), quando se tratam de produtos cujo pH se aproxima da neutralidade e cujos tratamentos térmicos que o originam não se mostram demasiado agressivos e portanto não contribuem para a alteração da sua estrutura.

B) Soluções acidificadas de *Spirulina* spp.

Neste ponto do procedimento experimental, pretendia-se estudar o comportamento da cianobactéria *Spirulina* spp. a diferentes valores de pH. No caso deste ingrediente, se preservada a sua cor verde-azulada (quando sujeito a diferentes valores de pH e aplicação de tratamento térmico) existiria a possibilidade de ser adicionado em combinação com a microalga em estudo, possibilitando a manutenção da cor verde dos produtos a desenvolver. A sua adição foi também considerada, porque são conhecidas algumas aplicações comerciais de *Spirulina* e *Chlorella vulgaris* em combinação. Após a incorporação de *Spirulina* spp. nas soluções e dos resultados obtidos, concluiu-se que a adição deste componente numa matriz líquida não apresentaria vantagem, já que apresentava grandes dificuldades na homogeneização e em pouco tempo verificava-se a deposição das partículas no fundo (figura 16). Apesar de se ter verificado que a aplicação da *Spirulina* spp. não seria vantajosa para as aplicações alimentares desenvolvidas posteriormente, foi, contudo, considerado ser importante avaliar o seu comportamento face a soluções com diferentes valores de pH.

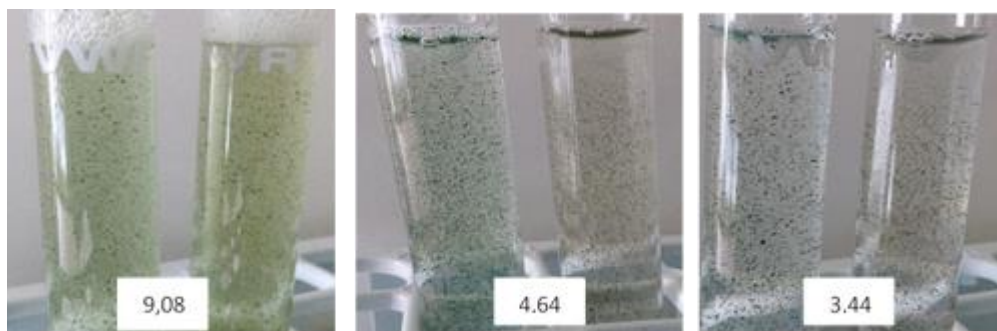


Figura 16 - Soluções de *Spirulina* spp. a diferentes valores de pH antes e após pasteurização (à esquerda antes da pasteurização e à direita após pasteurização)

Para além do processo de homogeneização ser mais difícil, como esperado, verificou-se um acastanhamento (ainda que pouco perceptível devido à rápida deposição das partículas) das soluções com valores de pH mais baixo após pasteurização (4,64 e 3,44). As diferenças verificadas foram significativas pois verificou-se que o valor de $p < 0,05$, não só em todos os parâmetros de cor avaliados, como também no tratamento térmico aplicado (Apêndice III – tabela 31). Apesar de visualmente se verificar um ligeiro acastanhamento das soluções, os valores registados para os parâmetros de cor nem sempre correspondem ao comportamento real das mesmas. A deposição da *Spirulina* no fundo dos recipientes era de tal modo rápida, que em alguns casos o tempo entre medições pode ter influenciado negativamente o comportamento das amostras.

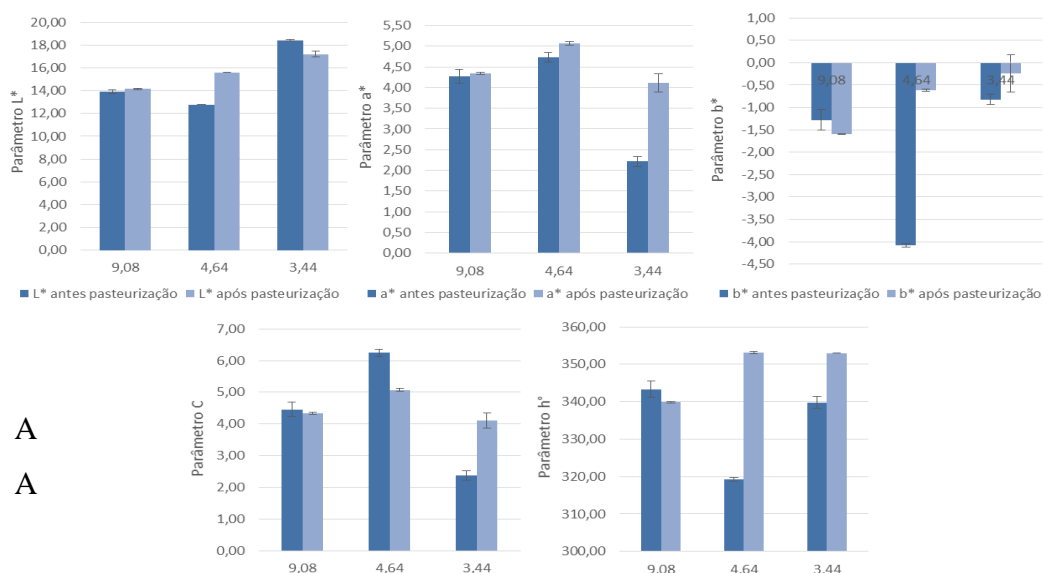


Figura 17 - Variações dos parâmetros de L^* , a^* , b^* , C e h° das soluções de *Spirulina* spp.

Através da análise dos gráficos que representam a variação dos parâmetros de cor antes e após pasteurização para diversos valores de pH verificamos que no caso da luminosidade (com exceção da amostra de pH=4,64 antes da pasteurização) os valores deste parâmetro aumentam com a diminuição do pH, o que se traduz em soluções mais claras (o valor de L* afasta-se do preto e tende a aproximar-se do branco).

Por outro lado, verifica-se um aumento deste parâmetro quando comparadas as soluções antes e após pasteurização (com exceção da amostra com pH=3,44). Através da análise gráfica e dos valores obtidos no teste de Tukey (tabela 32) é possível concluir que as soluções de pH=9,08 são as únicas que mantêm o valor de luminosidade antes e após pasteurização.

No que diz respeito ao parâmetro a* que representa a cor verde, no sentido negativo e a cor vermelha no sentido positivo, verificamos que as amostras de pH=9,08 e pH=4,64 são aquelas que registam os valores mais elevados para este parâmetro e que o valor de a* aumenta em todos os casos após pasteurização das soluções. Para além de verificarmos estas diferenças, através da análise estatística (tabela 33) podemos concluir que as amostras pH=9,08/pH=3,44; pH=9,08/pH=4,64 e pH=4,64/3,44 são distintas mesmo antes da aplicação de temperatura. Neste caso o fator determinante é o pH, já que mesmo antes de ser aplicado qualquer tratamento térmico as diversas soluções apresentam diferenças. Relativamente à amostra de pH=3,44 antes da pasteurização, verifica-se que apresenta diferenças em relação a todos os valores de pH após tratamento térmico.

Para o parâmetro b* o valor mais elevado é registado no pH=3,44 após pasteurização, ou seja, esta solução é aquela que mais se aproxima da cor amarela. Podemos também concluir que as soluções que sofrem menos alterações com a aplicação do tratamento térmico são aquelas cujo pH é mais próximo do neutro (9,08). Estatisticamente essas diferenças também são detetadas (tabela 34), quer entre os diferentes valores de pH, quer entre os tratamentos térmicos aplicados. A solução com pH=4,64 é aquela cujas diferenças são mais acentuadas, já que esta apresenta diferenças em relação às restantes antes da pasteurização, mas também é diferente entre si antes e após pasteurização.

Relativamente ao comportamento dos parâmetro saturação e ângulo hue face ao pH, verificamos que não seguem um padrão, ou seja em alguns casos verifica-se o aumento destes e noutros a sua diminuição, isto porque a cianobactéria rapidamente se depositava no fundo o que criava dificuldades na medição destes parâmetros. Tal como nos parâmetros anteriores para além das diferenças que são detetadas através da análise gráfica (figura 17), estatisticamente é possível verificar as diferenças (tabela 35 e 36).

Apesar das dificuldades apresentadas na medição destes parâmetros é perceptível, tal como nos parâmetros avaliados anteriormente que a solução com pH mais próximo da neutralidade é aquela que regista alterações menos significativas antes e após pasteurização.

De acordo com o objetivo proposto para esta parte do procedimento experimental, é possível verificar que a adição da *Spirulina* em combinação com a microalga *Chlorella* não apresenta vantagem a nível de preservação da cor das soluções. Para além das dificuldades na homogeneização, foi possível verificar que ocorre uma rápida sedimentação deste componente, originando claras diferenças de fases, o que do ponto de vista do consumidor pode ser percebido como negativo.

A falta de estabilidade face a diferentes valores de pH, o ligeiramente acastanhamento registado nas amostras de pH mais baixo e que sofrem tratamento térmico são também fatores que levam à não utilização deste ingrediente em produtos posteriormente desenvolvidos. Em suma, a utilização deste ingrediente apenas se mostra eficaz quando se tratam de valores de pH mais próximos da neutralidade e quando o tratamento térmico aplicado não é demasiado agressivo que possa levar à destruição da sua estrutura.

C) Soluções acidificadas de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

A combinação da microalga *Chlorella vulgaris* com a cianobactéria *Spirulina* spp. teve como objetivo não só enriquecer os produtos desenvolvidos, mas essencialmente manter a cor verde/azulada característica das duas quando submetidas a diversos fatores como o pH e o tratamento térmico.

Apesar de quando testadas em separado, os resultados não serem satisfatórios, porque com valores de pH baixos e com a aplicação de temperatura as duas tendem a acastanhar, foi necessário testar o seu comportamento quando combinadas. A variação dos parâmetros de cor destas soluções encontram-se representados na figura 18.

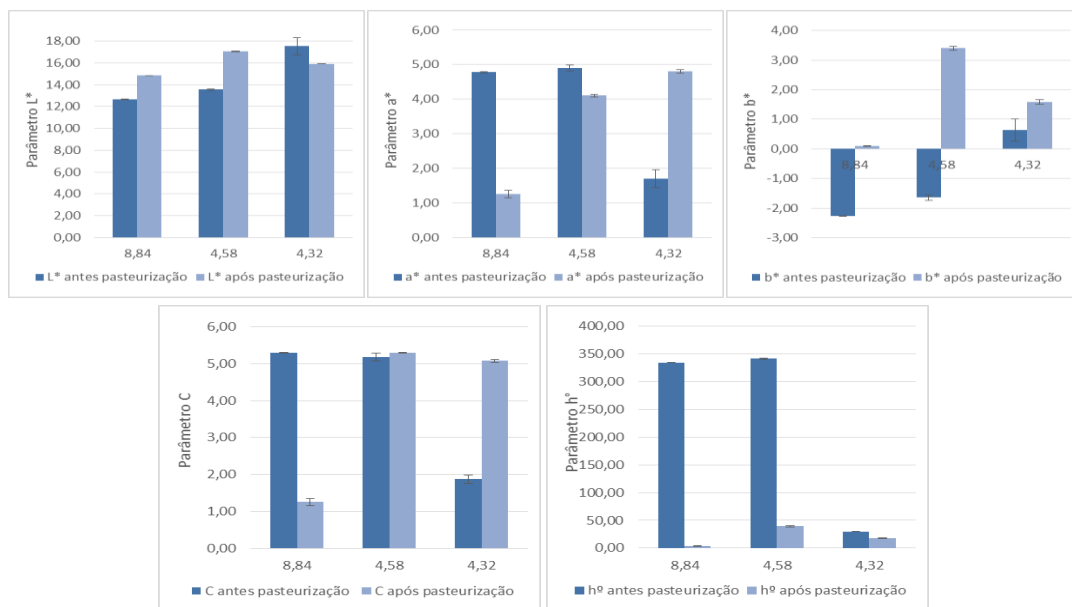


Figura 18 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° das soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

Através de uma primeira análise da representação gráfica concluiu-se que existiam diferenças em todas as amostras e que em praticamente todos os parâmetros a pasteurização potencia fortemente a alteração dos mesmos. Com recurso à análise estatística, foi possível determinar que existem diferenças significativas em todos os parâmetros obtendo-se um valor de p inferior a 0,05 (Apêndice IV - tabela 37).

No que diz respeito ao parâmetro L* é possível verificar que o valor elevado para este parâmetro foi registado na amostra de pH=4,32 após processamento térmico. No caso das soluções de *Spirulina* e *Chlorella* o comportamento da luminosidade, segue um padrão, ou seja, constatou-se que quanto menor o valor de pH, maior era o valor de L* obtido e portanto mais claras as soluções. Através da análise estatística respeitante a este parâmetro (tabela 38) verifica-se que existem diferenças em praticamente todas as amostras com a exceção da solução de pH=4,32 antes pasteurização quando comparada com a solução de pH=4,58 após pasteurização.

Neste caso, em particular e ao contrário dos resultados obtidos anteriormente mesmo as soluções de pH próximo da neutralidade apresentam diferenças antes e após pasteurização. O comportamento do parâmetro a^* nestas soluções parece ser contraditório quando comparado com o obtido anteriormente.

Neste caso, verificou-se que antes da pasteurização a solução com valor de pH mais baixo foi aquela que obteve o valor mais baixo para este parâmetro e portanto seria aquela que mais se aproximaria da cor verde.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos antes da pasteurização, após a aplicação de temperatura esta solução foi aquela que registou o valor mais elevado de a^* quando comparada com as restantes, fazendo com que esta seja a que mais se aproxima da cor vermelha e portanto será rejeitada à partida tendo em conta o propósito inicial. Através da análise estatística realizada para os valores de a^* (tabela 39) confirmam-se algumas das diferenças denotadas anteriormente, verificando-se que apenas não existem diferenças quando comparadas as soluções de pH=8,84 e pH=4,58 antes pasteurização. No caso das amostras após pasteurização constata-se que todas as amostras são diferentes entre si.

Acerca do parâmetro b^* que posiciona as amostras segundo a sua cor (amarelo - sentido positivo; azul - sentido negativo) pode dizer-se que neste caso as amostras são muito diferentes, verificando-se que com a diminuição do pH a cor tende a aproximar-se do amarelo.

O valor mais próximo da cor azul é obtido pela amostra de pH=9,08 antes da pasteurização, sendo que o seu valor altera-se, tomando valores positivos após pasteurização. Contrariamente a amostra com valor de b^* mais elevado e portanto mais próxima do amarelo é aquela com pH=4,58 após pasteurização, seguindo-se a amostra de pH=4,32 após pasteurização. Através da realização do teste de Tukey comprovou-se que estatisticamente existem diferenças significativas em todos os valores de pH independentemente da aplicação de temperatura ($p < 0,05$) (os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela 40).

Para o parâmetro C foi possível verificar que a solução de pH=8,84 antes da pasteurização é aquela que apresenta um valor mais alto, ou seja, é o mais saturado. Para o valor de pH=4,58 verifica-se que praticamente não existe alteração deste parâmetro antes e após pasteurização.

Relativamente ao parâmetro h° é possível verificar grandes diferenças entre as diversas amostras. O valor mais alto para este é obtido para a solução de pH=4,58 antes da pasteurização, pelo contrário o valor mais baixo é registado pela amostra com pH=8,84 após pasteurização. As amostras de pH=8,84 e 4,58 antes da pasteurização registam valores para o ângulo próximos de 330° , fazendo com que estas se encaixem no quadrante que contempla as cores entre o violeta e púrpura.

Por outro lado, as amostras com os mesmos valores de pH mas que sofreram pasteurização e as amostras com pH=4,32 (antes e após pasteurização) obtêm valores de ângulo próximo de 40° o que faz com que estas amostras se situem no quadrante que contempla a cor púrpura e a cor vermelha. Estatisticamente é possível verificar a existência de diferenças isto porque o valor de p obtido é inferior a 0,05 (os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela 42).

Tal como esperado, a combinação destes dois ingredientes não se mostrou vantajosa quando se fala da preservação da cor verde das soluções. Neste caso, contrariamente ao verificado nas experiências anteriores até mesmo nas soluções com pH próximo da neutralidade ocorrem alterações de cor. Através da análise visual podemos ainda concluir que, neste caso não se verifica a deposição das partículas no fundo, o que se pode dever à maior concentração de *Chlorella* em relação à *Spirulina spp.*, fazendo com que a primeira se sobreponha à segunda.

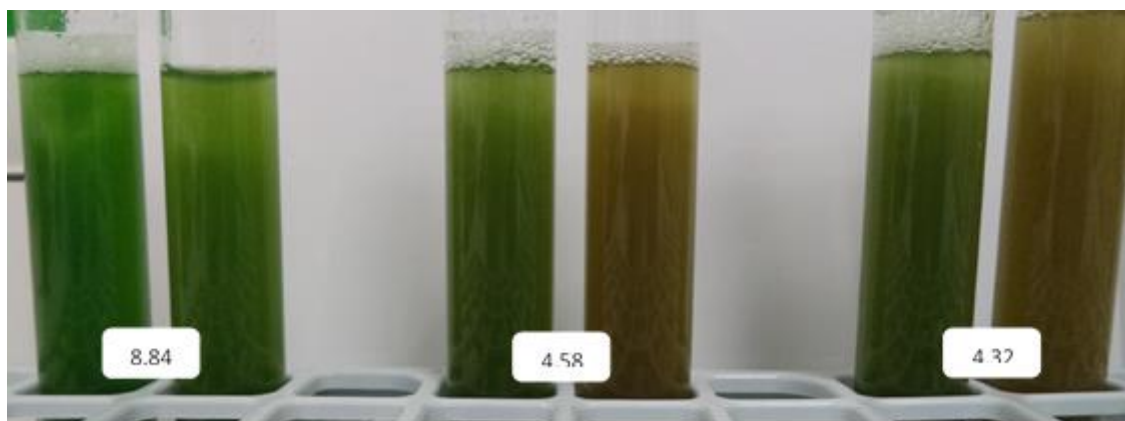


Figura 19 - Soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina spp.* a diferentes valores de pH (à esquerda antes da pasteurização, à direita após pasteurização)

D) Preparado de *Chlorella vulgaris*

A figura 20 representa a análise de componentes principais de um preparado com *Chlorella vulgaris* a diferentes valores de pH. Com esta análise pretendeu-se avaliar a influência do pH na cor de uma solução composta (com mais de dois ingredientes) e verificar se existem diferenças.

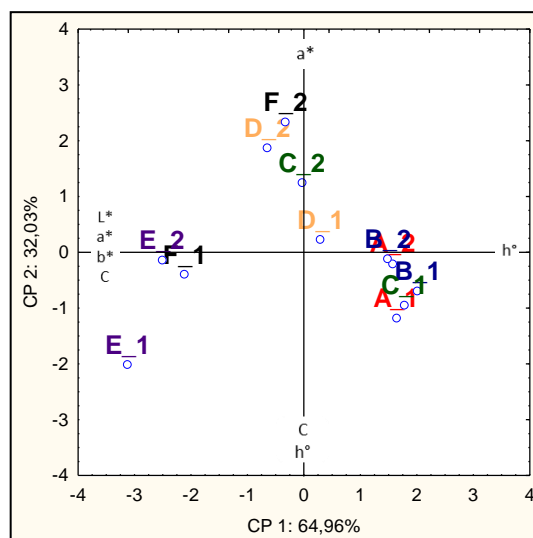


Figura 20 - Análise de componentes principais que representa a variação de cor do preparado com *Chlorella vulgaris*. A codificação utilizada foi: A-Amostras controlo (pH=6,95), B-Amostras pH=6,95, C-Amostras pH=5,67; D-Amostras pH=4,21; E-Amostras pH=3,24; F-Amostras pH=2,67 e os números que procedem as letras correspondem ao tratamento térmico aplicado, ou seja, 1-corresponde às soluções antes da pasteurização e 2-corresponde às soluções após pasteurização.

Através da análise da figura verifica-se que existe uma clara separação de algumas amostras quer em relação à componente principal 1 quer à 2. Neste caso as amostras E_1, E_2 e F_1 parecem destacar-se em relação às restantes. Estatisticamente é possível concluir que efetivamente existem diferenças significativas entre as amostras já que o valor de p obtido em cada parâmetro é menor que 0,05 (tabela 43). Relativamente à análise de componentes principais, esta resume cerca de 96% da informação inicial em duas componentes principais. Na CP1, representada no eixo horizontal, estão representados cerca de 65% dos dados iniciais. Esta componente representa as variações de L*, a*, b* e C que aumentam no sentido negativo do eixo e no sentido positivo está também representada a variação de tonalidade das amostras.

Na CP 2, onde vemos representados cerca de 32% dos dados iniciais (no eixo vertical do gráfico), observam-se as variações dos parâmetros C e h° no sentido negativo da componente e o parâmetro a^* que aumenta no sentido positivo do eixo. Após análise da componente principal 1 é possível concluir que as amostras E_1 (pH=3,24 antes pasteurização), E_2 (pH=3,24 após pasteurização) e F_1 (pH=2,67 antes pasteurização) se afastam das restantes, porque obtêm valores mais elevados para os parâmetros L^* , a^* , b^* e C. Pelo contrário as amostras B_2, A_2, B_1, C_1, A_1 tendem a aglomerar-se e obtêm valores de h° mais elevados que as restantes, ou seja, valores de pH mais próximos da neutralidade são praticamente iguais em termos de cor e também para estes o valor do ângulo hue é mais elevado. É ainda possível concluir que em relação à luminosidade as amostras E_1 e E_2, as amostras com pH=3,24 antes e após pasteurização não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) (os resultados encontram-se expressos na tabela 44), o que leva a concluir que neste caso o fator que provoca a maior degradação da clorofila é o pH já que antes e após pasteurização as amostras não apresentam diferenças.

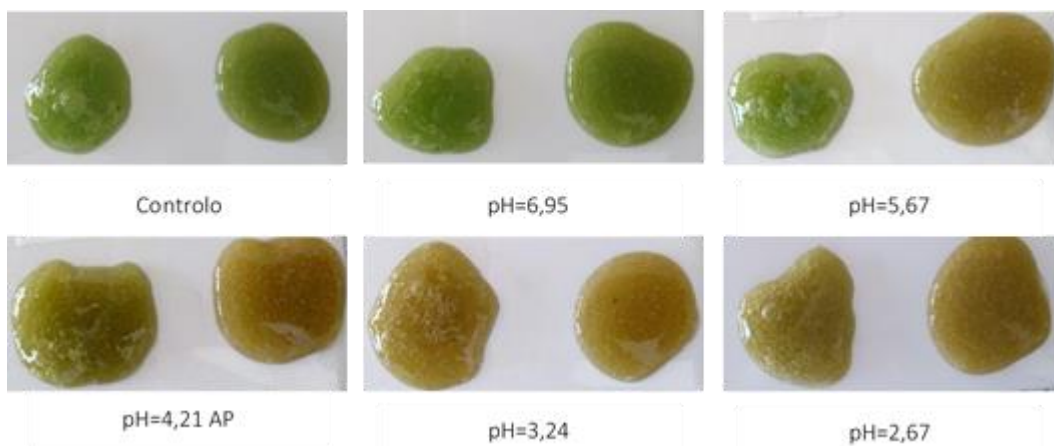


Figura 21 - Amostras preparado com *Chlorella vulgaris* (amostras à esquerda antes pasteurização, amostras à direita após pasteurização)

Analisando a componente principal 2 verificamos que a amostra F_2 se separa das restantes, isto porque, obtêm valores de a^* mais elevados que as restantes. Esta diferença resulta numa solução cuja cor se aproxima do amarelo. Assim as soluções com pH mais baixo, tal como nas experiências anteriores tendem a acastanhar, devido à presença da clorofila que faz parte da composição da microalga. Em suma, pode dizer-se que apenas existem semelhanças entre as amostras com valores de pH mais baixos (antes e após pasteurização), que representam na prática soluções mais claras e ao mesmo tempo mais acastanhadas que as restantes.

4.3 Efeito do processamento térmico na carga microbiológica

A fim de determinar o binómio capaz de reduzir a carga microbiológica foram testados diferentes tempos e temperaturas. Inicialmente e tendo em conta a carga inicial do lote 1 foi necessário confirmar o valor constante no boletim de análises cedido pelo fornecedor.

Segundo os resultados que constam da tabela 16 o valor obtido nas análises efetuadas é muito semelhante ao cedido pelo fornecedor. De modo, a diminuir a carga inicial determinada foram aplicados diferentes binómios temperatura/tempo. É possível verificar, através da observação da tabela 16 que as condições de tratamento térmico com maior efetividade na redução da carga microbiana da amostra correspondente ao lote 1 (cuja carga inicial de microrganismos totais era de $6,7 \times 10^7$ ufc/g), foram aquelas que em que se aplicaram temperaturas mais elevadas e em tempos curtos de pasteurização. O binómio 85 °C,10 minutos permitiu reduzir a carga inicial de microrganismos totais cerca de 3 ciclos Log, por outro lado o binómio 90 °C,5 minutos permitiu a diminuição em cerca de 4 ciclos Log.

Apesar de se ter verificado uma redução da carga microbiológica, nos binómios referidos anteriormente as temperatura/tempos que eliminaram por completo a carga inicial foram 95 °C, 10 minutos e 95 °C, 5 minutos. A partir dos resultados obtidos foi selecionado o binómio 95 °C, 5 minutos, de modo a tentar preservar a cor verde (como visto anteriormente a microalga sofre alterações com temperaturas e tempos de pasteurização mais agressivos) dos produtos posterior desenvolvidos e ao mesmo tempo garantir a segurança alimentar.

No caso dos lotes 2 e 3 foi possível verificar (segundo constante nos boletins de análises) que a carga microbiológica inicial era inferior ($6,0 \times 10^3$ ufc/g no caso do lote 2 e $4,0 \times 10^1$ ufc/g no caso do lote 3). Como se registou uma diminuição, foi possível aplicar um binómio menos agressivo contribuindo não só para a manutenção da cor nos produtos finais, como também dos valores nutricionais.

Tabela 16 - Resultados análises microbiológicas após aplicação de diferentes binómios de soluções com 1% de *Chlorella vulgaris*

	PCA	YGC		RCM
		Leveduras	Bolores	
Matéria-Prima	$8,43 \times 10^7$ ufc/g	$4,00 \times 10^4$ ufc/g	1	$8,36 \times 10^1$ ufc/g
85 °C,10 min	$4,30 \times 10^4$ ufc/g	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	$1,25 \times 10^2$ ufc/g
90 °C,5 min	$9,45 \times 10^3$ ufc/g	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)
95 °C,5 min	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)
95 °C,10 min	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)
120 °C,15 min	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)	ND (<10 ufc/g)

4.4 Aplicação da microalga *Chlorella vulgaris* em matrizes alimentares

Neste subcapítulo são apresentadas as aplicações da microalga em matrizes alimentares. O desenvolvimento dos produtos teve em conta a obtenção de matrizes viáveis não só tecnologicamente, mas essencialmente apelativas visualmente e organoleticamente para o consumidor final. Assim as aplicações pretendem potenciar não só o poder corante da microalga como também o enriquecimento nutricional dos mesmos.

A) Smoothies com aplicação de *Chlorella vulgaris*

A crescente procura do consumidor pelos sumos “green” (sem aditivos) e pelas bebidas “detox” tão em voga ultimamente, levou ao desenvolvimento de algumas versões de *smoothies*, nas quais era incorporada a microalga. As formulações desenvolvidas (tabela 17) tiveram em conta não só o enriquecimento nutricional dos produtos, como também a incorporação de ingredientes inovadores que eram utilizados por outros em formulações de sumos detox.

Tabela 17 - Formulações de *smoothies* com *Chlorella vulgaris*

Matéria-Prima	Versão 1 (%)	Versão 2 (%)	Versão 3 (%)	Versão 4 (%)	Versão 5 (%)	Versão 6 (%)	Versão 7 (%)
Água Fria	0,57	0,75	2,26	0,64	0,18	0,28	27,95
Sumo Ananás*	10,00	10,00	14,99	10,01	16,00	16,00	18,33
PuréFramboesa*	6,00	--	--	--	--	--	--
Sumo Laranja*	47,43	21,25	21,25	21,25	18,75	18,75	18,75
Sumo Maçã*	26,00	--	--	--	--	--	--
Puré de Manga*	8,00	35,00	35,00	35,00	34,00	34,00	--
Polpa de banana	--	16,00	14,00	16,00	14,00	14,00	16,00
Polpa de Maçã	--	15,00	12,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Sumo Maracujá	--	--	--	--	--	--	2,00
Extracto Guaraná	--	--	--	--	--	0,10	0,10
Concentrado vegetal	--	--	--	--	0,20	--	--
Erva trigo	1,00	1,50	--	0,10	--	--	--
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,00	0,50	0,50	2,00	1,87	1,87	1,87

Tabela 18 - Valores de pH e °Brix após preparação e 24 horas dos *smoothies* desenvolvidos

	Versão 1	Versão 2	Versão 3	Versão 4	Versão 5	Versão 6	Versão 7
pH após preparação	4,09	4,08	4,10	4,00	4,35	4,16	4,19
pH 24 horas depois	4,09	3,86	4,08	3,93	4,35	4,35	4,35
Brix após preparação	12,8	16,4	16,7	16,2	17,7	15,4	11,3
Brix 24 horas depois	13,1	16,9	16,8	16,1	17,6	15,5	11,5

Na tabela 18 encontram-se os valores de pH e °Brix (após preparação e 24 horas após preparação) para todas as versões desenvolvidas.

A versão 1 foi a formulação que serviu como base para a reformulação e construção das restantes, tendo sido adaptada a partir de uma já existente na base de dados da Frulact. Foram utilizados nesta frutos como o ananás e a laranja, que serviriam para controlar o valor de pH (mantendo-o abaixo de 4,00) e desempenhariam uma função importante disfarçando o sabor intenso a mar conferido pela microalga (sabor que não se pretende realçar em bases doces). Esta versão contou ainda com a adição de erva de trigo com o objetivo de enriquecer o produto a nível nutricional. Após prova e segundo o descrito pelos provadores foi possível concluir que esta versão era de textura muito líquida e que o sabor a mar conferido pela microalga era superior a qualquer outro. Verificou-se ainda que o puré de framboesa não seria compatível em termos de sabor com este tipo de bases. Com a versão 2 pretendia-se tornar o produto menos fluído e disfarçar o sabor a mar diminuindo a concentração da microalga que seria compensada pela adição de erva de trigo. Relativamente à fluidez do produto isso foi conseguido através do aumento da concentração de puré de manga e banana, mas relativamente ao sabor a maior concentração de erva de trigo fez com que o sabor desta se acentua-se em relação a todos os outros. Na versão 3 eliminou-se a erva de trigo e manteve-se a concentração da microalga em relação à versão anterior, sendo que esta redução foi denotada pelos provadores como bastante positiva. A partir da versão 4 a concentração de microalga adicionada rondou quase sempre os 2%, isto porque foi possível verificar que com esta quantidade era possível obter determinadas quantidades significativas de minerais como o ferro e o cobre (tabela 19).

Tabela 19 - Valores de diversos minerais e quantidades correspondentes de *Chlorella vulgaris* a adicionar (os valores utilizados para o cálculo das quantidades significativas e do VRN foram retiradas do Reg. n.º1169/2011)

	VRN (Valor Referência nutriente, mg)	Quantidade/100 g <i>Chlorella</i> (mg)	Quantidade significativa (bebidas, mg)	Quantidade a adicionar <i>Chlorella</i> (g)
Fósforo	700	1200	52,5	4,4
Potássio	2000	2600	150	5,77
Cálcio	800	1600	60	3,75
Ferro	14	240	1,05	0,44
Magnésio	375	180	28,13	15,63
Zinco	10	6,8	0,75	11,03
Cobre	1	2,8	0,075	2,68

Na versão 5 foi utilizado um concentrado vegetal natural de cor verde, de modo a preservar a cor e a conotação de natural. Após pasteurização do produto não se verificou o pretendido e tal como nas versões anteriores o produto sofreu um ligeiro acastanhamento e o sabor da microalga continuava muito acentuado, verificando-se deste modo, que a quantidade de concentrado não seria suficiente para se sobrepor à quantidade de microalga. Por fim na versão 6 e 7, acrescentou-se extrato de guaraná, por se saber que esta matéria-prima era utilizada por outros na formulação de sumos *detox*. Relativamente a estas versões os provadores verificaram que o sabor da microalga era muito intenso e que a sua combinação com bases doces não seria muito positiva.

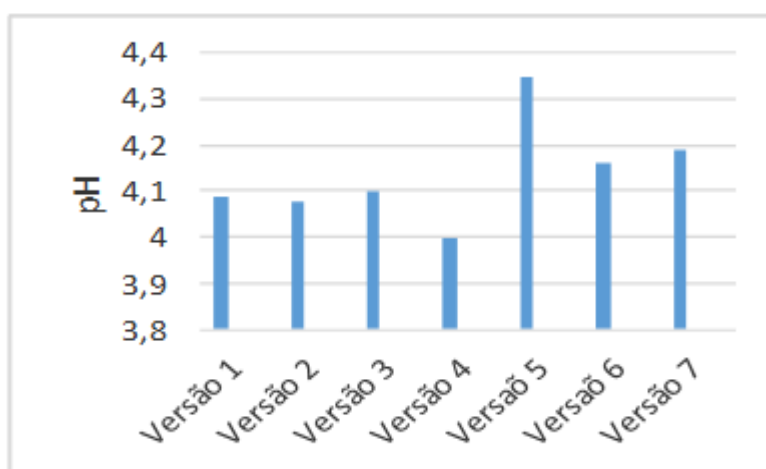


Figura 22 - Valores de pH obtidos em cada versão de *smoothie*

O valor de pH de um *smoothie* de frutos encontra-se geralmente abaixo de 4, isto porque os frutos que o compõem habitualmente têm valores da mesma ordem de grandeza (ananás pH=3,2-4; banana pH=4,5-5,2; laranja pH=3,0-4,0; limão pH=2,2-2,4; maçã pH=3,3-4,1 (Somogyi *et al*, 1996). Contrariamente as microalgas em geral crescem num intervalo de pH ótimo situado entre 8,7 e 10 (Richmond, 2008). Nas várias versões elaboradas os valores de pH situam-se um pouco acima de 4 e verifica-se que quanto maior a concentração da microalga maior o valor deste parâmetro. A adição da microalga força a diminuição dos iões H^+ provenientes dos frutos em solução devido ao seu valor de pH consideravelmente superior, que resulta no aumento do pH.

Do ponto de vista dos provadores foi possível concluir que quanto maior a concentração de microalga adicionada, mais intenso será o sabor a mar e portanto menos apelativo (organoleticamente) será o *smoothie* para o consumidor. Verificou-se ainda que após processamento térmico e devido ao baixo valor de pH conferido pelas matérias-primas adicionadas, estas matrizes tendem a sofrer um acastanhamento que pode ser percebido pelos consumidores como negativo. Ao longo do tempo regista-se ainda em todas as formulações a deposição das partículas mais pesadas no fundo dos recipientes originando uma clara separação de fases. Aliando o acastanhamento à separação de fases registadas seria necessário, caso o produto fosse comercializado, que o seu armazenamento contempla-se uma embalagem mais escura. A versão considerada pelos provadores mais agradável organoleticamente foi a 3, aquela com apenas 0,5% de microalga o que pode indicar que a combinação da microalga com bases de fruta pode não ser apelativa para o consumidor.

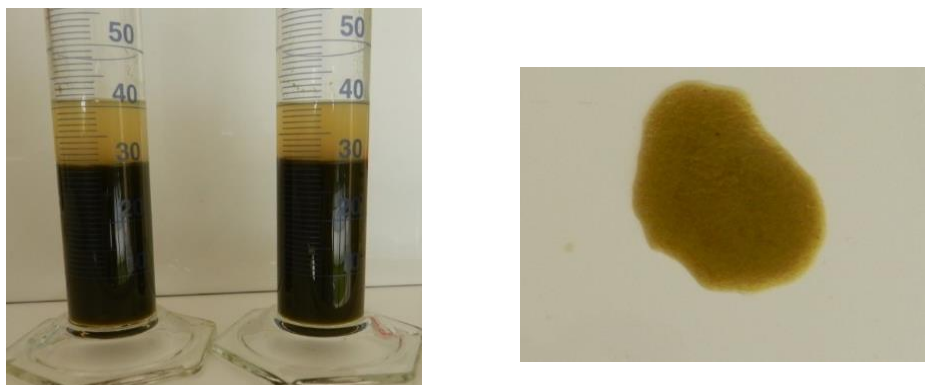


Figura 23 - Fenómeno de deposição nas formulações de *smoothies* (à esquerda), aspeto *smoothie* após pasteurização (à direita)

B) Frushapes de banana com *Chlorella vulgaris*

No que diz respeito a esta aplicação alimentar a avaliação dos parâmetros físico-químicos focalizou-se em duas partes distintas. Na primeira parte foram avaliados os *frushapes* propriamente ditos em relação apenas aos parâmetros de cor, já que a evolução destes era essencial para compreender o comportamento (ao longo do tempo) da microalga quando aplicada numa matriz alimentar. Numa segunda parte, após aplicação dos *frushapes* num preparado foram avaliados não só os parâmetros de cor ao longo do tempo (que permitiram verificar se existia migração de cor dos *frushapes* para o preparado e consequentemente avaliar o poder corante da microalga), como também os valores de pH,

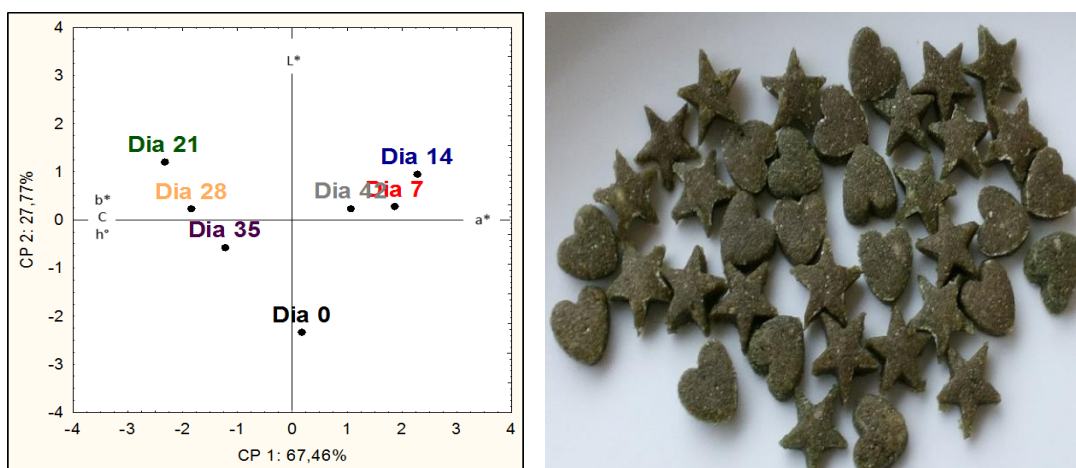


Figura 24 - Análise de componentes principais para as variações de cor de *frushapes* com *Chlorella vulgaris* (à esquerda), *frushapes* na sua forma seca (à direita)

°Brix e viscosidade a fim de dar indicações sobre o estado do produto.

A análise de componentes representa a evolução de cor dos *frushapes* secos ao longo de 42 dias de amostragem. Como se pode verificar, através da observação da figura 24 o dia 0 é aquele que apresenta maior distância em relação aos restantes. Para além disso verifica-se a não existência de um comportamento padrão, já que as amostras em cada dia de amostragem assumem comportamentos distintos. Estatisticamente é possível concluir que essas diferenças existem e que são bastante significativas, isto porque o valor de p obtido em cada parâmetro é bastante inferior a 0,05 (tabela 51).

Relativamente à análise de componentes principais, esta condensa cerca de 96% da informação inicial em duas componentes principais. Na CP1, representada no eixo horizontal, estão cerca de 68% dos dados iniciais. Esta componente representa as variações de b^* , C e h que aumentam no sentido negativo do eixo e no sentido positivo está representada a variação do parâmetro a^* . Através da sua análise podemos concluir que as amostras avaliadas nos dias 21, 28 e 35 são por um lado aquelas que obtêm valores mais elevados de b^* , C e h e que apenas existem diferenças significativas (tabelas 54, 55 e 56) quando as comparamos em relação ao parâmetro h° (nos parâmetros b^* e C estas 3 amostras não apresentam diferenças significativas entre si). Por outro lado é possível verificar que para o parâmetro b^* ao longo do tempo as amostras não apresentam variações significativas (tabela 54). Apesar de não se registarem diferenças significativas existe um pequeno aumento do valor de b^* indicando que as amostras deslocam-se no sentido de se aproximarem da cor amarela (resultando num ligeiro acastanhamento).

Quanto ao parâmetro a^* que se encontra também representado na CP1, pode dizer-se que as amostras obtêm valores mais altos para este parâmetro nos dias 7 e 14 e que no dia 42 o valor de a^* se aproxima muito dos dias mencionados anteriormente. Através da análise estatística verificamos que para este parâmetro os dias 0, 7, 14 e 42 não apresentam diferenças significativas (tabela 57).

Na CP2, que se encontra representada no eixo vertical do gráfico, estão cerca de 28% dos dados iniciais. Esta componente representa as variações do parâmetro L^* no sentido positivo do eixo. Através desta componente é possível verificar que o dia 0 se separa dos restantes e que a luminosidade neste dia de amostragem é bastante inferior aos restantes. Tal como verificamos através da tabela 53 o dia 0 apresenta diferenças significativas neste parâmetro quando se compara com os restantes dias de amostragem.

Em suma, a amostra no dia 0 é aquela que se destaca, as restantes seguem um comportamento muito semelhante. Deste modo é possível concluir que o fator tempo de armazenamento não tem grande influência na cor final desta aplicação e que em bases deste género a microalga parece funcionar quando se fala do seu poder corante.

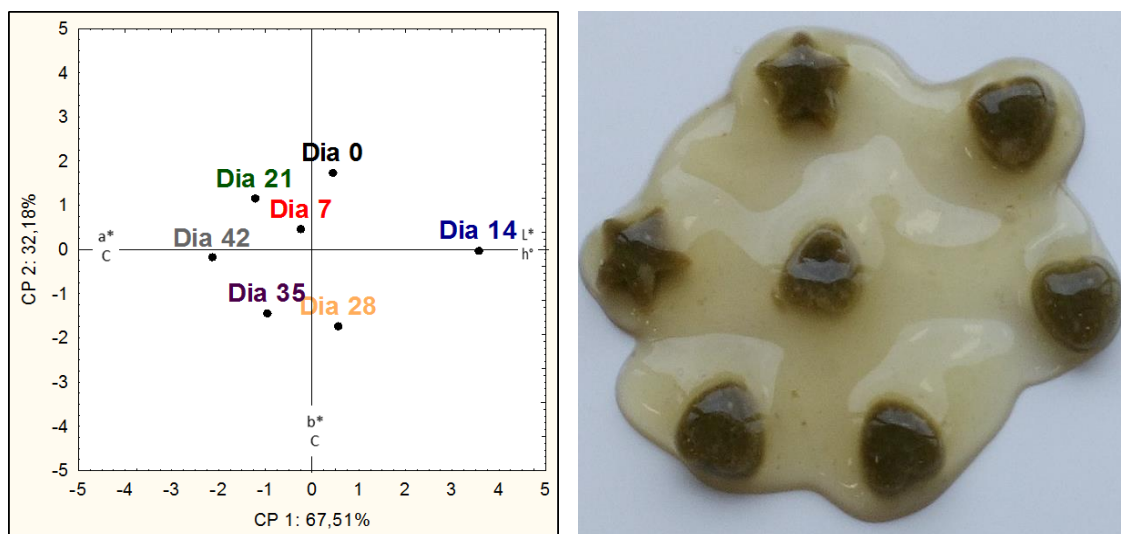


Figura 25 - Análise de componentes principais para as variações de cor do preparado com *frushapes* (à esquerda), *frushapes* aplicados em preparado (à direita)

A análise de componentes principais representa a evolução de cor do preparado com a adição de *frushapes* ao longo de 42 dias de amostragem. Esta avaliação da cor ao longo do tempo foi importante, já que através dela é perceptível se existe ou não perda de cor dos *frushapes* para o preparado. Como se pode verificar, através da observação da figura 25 o dia 14 é aquele que apresenta maior distância em relação aos restantes. Os restantes dias de amostragem apesar de parecerem diferentes, a magnitude dessa diferença não é tão elevada. Estatisticamente essas diferenças existem e são bastante significativas, isto porque o valor de p obtido em cada parâmetro é bastante inferior a 0,05 (tabela 52).

Relativamente à análise de componentes principais, esta engloba 99% da informação inicial em duas componentes principais. Na CP1, representada no eixo horizontal, estão cerca de 68% dos dados iniciais. Esta componente representa as variações de a^* e C que aumentam no sentido negativo do eixo e no sentido positivo estão representadas as variações dos parâmetros L^* e h° . Analisando esta componente verificamos que a amostra no dia 14 assume valores mais elevados nos parâmetros L^* e h° separando-se das restantes. Quando analisamos os valores obtidos no teste Tukey para estes dois parâmetros verificamos que o dia 14 apresenta diferenças significativas quando comparado com os restantes dias de amostragem (tabelas 58 e 59).

Relativamente à variação dos parâmetros a^* e C concluímos através da análise de componentes principais que estes tendem a aumentar ao longo do tempo de armazenagem, sendo que a amostra no dia 42 é aquela que regista os valores mais elevados para estes dois parâmetros e que todas as amostras são diferentes entre si. Quando analisamos estatisticamente os diferentes dias de amostragem verificamos que para o parâmetro a^* apenas existem semelhanças neste parâmetro quando se compara o dia 0 com o dia 28 (tabela 60).

Analisando a componente principal 2 que representa 32% dos dados iniciais e na qual se registam as variações dos parâmetros b^* e C que crescem no sentido negativo do eixo, verificamos que as amostras correspondentes aos dias 28 e 35 distanciam-se em relação às restantes obtendo os valores mais elevados dos parâmetros b^* e C. Através da análise estatística verificamos que nestes dois dias se registam diferenças significativas quando comparadas com quase todos os dias de amostragem (tabelas 61 e 62).

Através dos dados obtidos da análise dos parâmetros de cor ao longo de 42 dias de amostragem é possível verificar que em todos os parâmetros se registam diferenças entre os vários dias analisados. De acordo com as alterações verificadas pode dizer-se que existe alteração de cor do preparado, indicando que se verifica a migração da cor dos *frushapes* para o preparado.

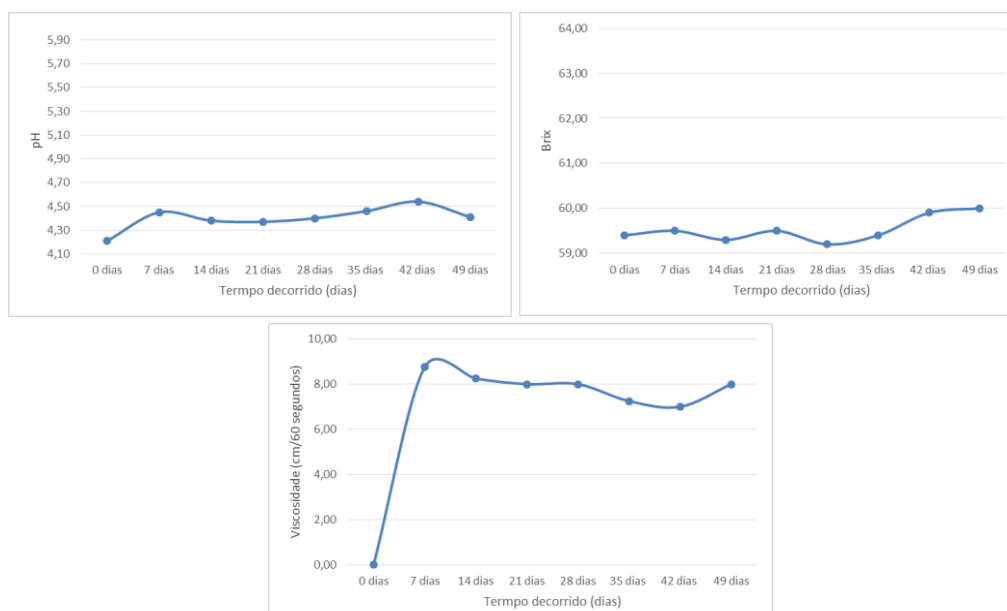


Figura 26 - Evolução dos parâmetros físico-químicos do preparado com aplicação de *frushapes* de *Chlorella vulgaris* (em cima à esquerda: pH, em cima à direita: Brix, em baixo: viscosidade)

Através da análise da figura 26, onde se encontram representados os parâmetros físico-químicos do preparado que contêm os *frushapes*, é possível verificar que os valores de pH e °Brix mantêm-se praticamente inalterados ao longo do tempo de amostragem. Entre o dia 0 e 7 existe uma normalização destes parâmetros que se mantêm a partir daí praticamente inalterados, com exceção do dia 49 no qual o valor de pH regista uma pequena descida podendo indicar alterações do produto. Essas alterações poderiam ser comprovadas se o produto tivesse sido analisado durante mais tempo. Relativamente aos valores de viscosidade, verificamos que entre o dia 0 e 7 (tal como nos casos anteriores) existe uma normalização dos valores deste parâmetro, sendo que a partir deste dia a amostra parece seguir o mesmo comportamento.

Relativamente à análise efetuada pelos provadores a nível do laboratório, mais uma vez foi possível concluir que em bases doces a aplicação da microalga não é apelativa do ponto de vista organoléptico, isto porque apesar da quantidade adicionada ser reduzida o sabor a mar é bastante intenso e consegue sobrepor-se aos restantes. Deste modo, aliando a migração de cor verificado dos *frushapes* para o preparado ao fato de o produto não ser apelativo organolepticamente, conclui-se que este produto poderá não ser interessante para o consumidor final.

C) Preparado salgado com *Chlorella vulgaris*

A aplicação da microalga em matrizes alimentares salgadas surge como alternativa para mascarar o sabor predominantemente mar conferido por esta (figura 27).



Figura 27 - Preparado salgado (à esquerda) preparado salgado aplicado em queijo “Philadelphia” (à direita)

Através da análise da figura 28, onde se encontram representados os parâmetros físico-químicos do preparado salgado com *Chlorella vulgaris*, é possível verificar que os valores de pH e °Brix sofrem pequenas mudanças ao longo do tempo de amostragem. Verifica-se também que no dia 13 o preparado aplicado em queijo “philadelphia” regista uma diminuição do valor de pH que depois é compensado e mantêm-se constante até ao final do tempo de amostragem. Com exceção do dia 13 os parâmetros mantêm-se praticamente inalterados, sendo possível verificar que no último dia de amostragem (dia 35) os valores de pH e °Brix registam uma pequena descida podendo indicar alterações do produto. Essas alterações poderiam ser verificadas se o produto tivesse sido analisado durante mais tempo. Relativamente à análise efetuada pelos provadores a nível do laboratório, ao contrário dos casos anteriores este tipo de preparado (salgado) parece ter sido mais apelativa do ponto de vista organolético, isto porque o sabor a mar conferido pela microalga parece combinar com os outros ingredientes que compõe a formulação.

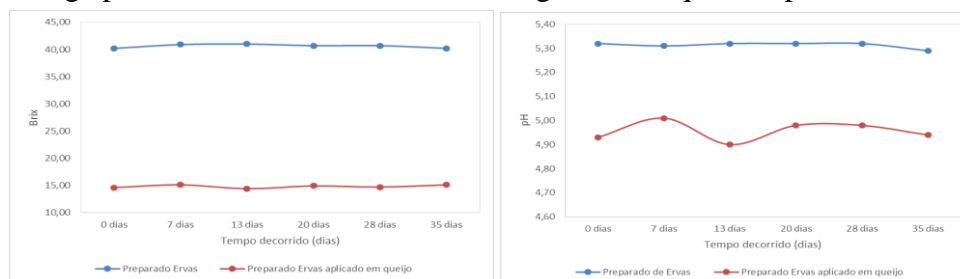


Figura 28 - Variações dos parâmetros de pH e °Brix do preparado salgado com *Chlorella vulgaris* ao longo de 35 dias de amostragem

D) “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

Com a aplicação da microalga na matriz alimentar anterior foi possível concluir que as bases salgadas poderiam ser uma alternativa viável, quando se fala de mascarar o sabor mar conferido pela microalga. Devido à grande aceitabilidade demonstrada pela base salgada acrescentaram-se depois legumes de modo a enriquece-la do ponto de vista nutricional.

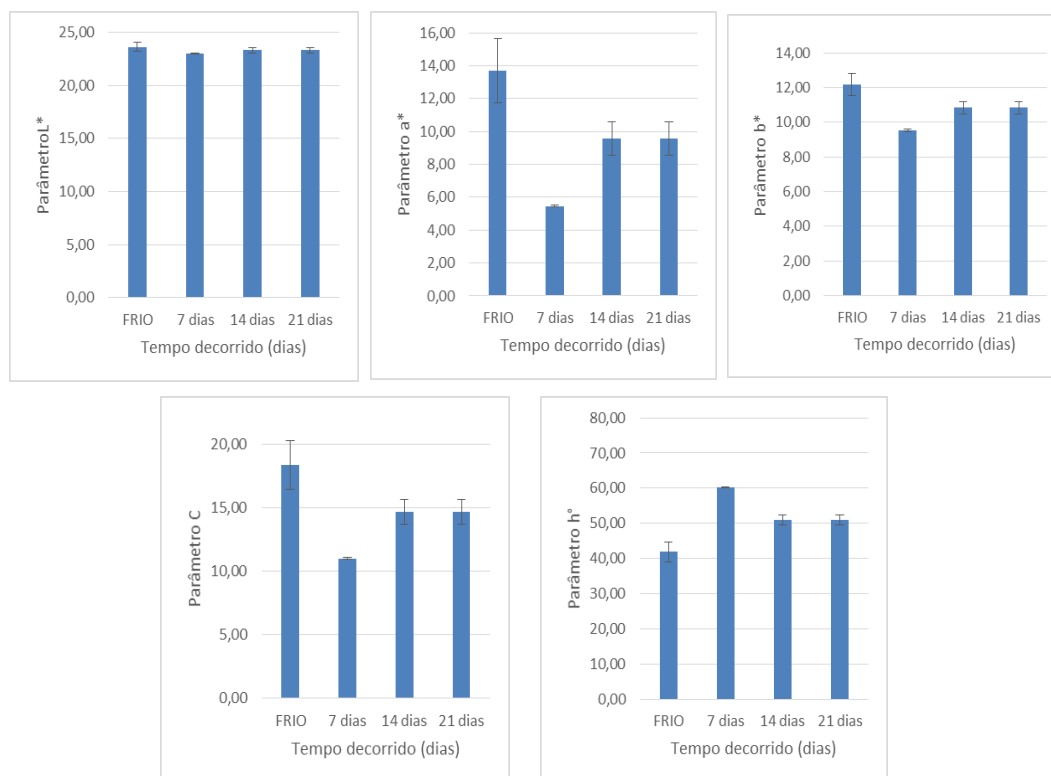


Figura 29 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris* ao longo do tempo

Com a análise da evolução dos parâmetros de cor (representados na figura 29), verificou-se que apenas as amostras correspondentes ao sétimo dia desde a preparação assumem um comportamento contrário em relação aos restantes dias, ou seja, nos parâmetros L*, a*, b* e C ocorre uma diminuição de valores e no parâmetro h° ocorre um aumento. Estatisticamente existem diferenças para cada um dos parâmetros quando comparados os dias de amostragem, isto porque $p < 0,05$ (os resultados encontram-se expressos na tabela 66). Apesar de serem diferentes estatisticamente a magnitude desta diferença não é tão elevada como em experiências realizadas anteriormente.

No que diz respeito ao parâmetro L^* que representa a luminosidades das amostras verificamos que este apresenta um comportamento similar ao longo dos dias, com exceção do dia 7, sendo este o único que apresenta uma diminuição do parâmetro deslocando a amostra no sentido de cores mais escuras. Tal com verificado pela análise gráfica, estatisticamente para o parâmetro L^* apenas existem diferenças significativas quando comparada a amostra no dia 0 com o dia 7 (tabela 67). Relativamente ao parâmetro a^* verificamos que apenas não existem diferenças entre as amostras quando comparamos o dia 14 com o dia 21 (tabela 68). Para os parâmetros b^* , C e h° o comportamento é igual (tabelas 69, 70 e 71).

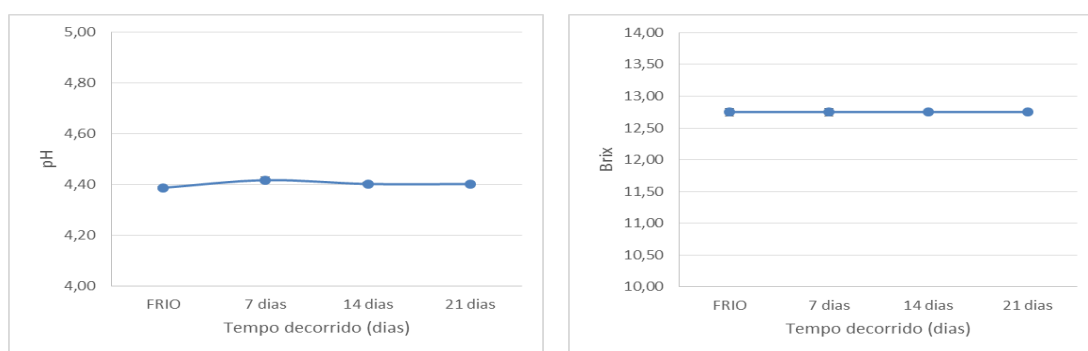


Figura 30 - Variações dos parâmetros de pH e °Brix do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris* ao longo do tempo

Através da análise da figura 30, onde se encontram representados os parâmetros físico-químicos do “Preparado mediterrânico”, é possível verificar que os valores de pH e °Brix mantêm-se praticamente inalterados ao longo do tempo de amostragem. Através da análise dos parâmetros é possível verificar que ao fim de 21 dias de amostragem o produto encontra-se apto para consumo.

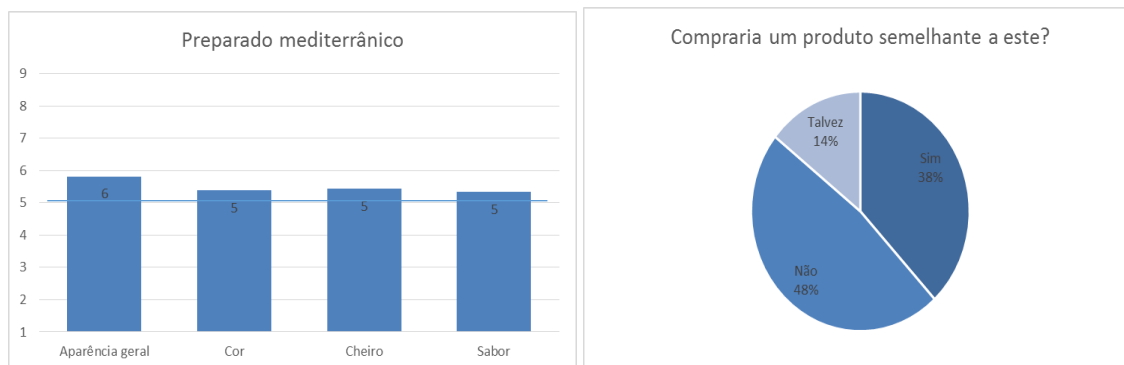


Figura 31 - Resultados testes de aceitabilidade realizados aos consumidores do “Preparado mediterrânico”. Caracterização do produto (à esquerda), opção de compra (à direita)

A análise sensorial do “Preparado mediterrânico” forneceu importantes indicações, já que através das conclusões retiradas é possível ter uma perspetiva de como o produto poderá ser aceite pelo consumidor final. Neste caso, todos os parâmetros avaliados foram pontuados positivamente já que os valores obtidos foram superiores à média. O parâmetro “Aparência geral” foi aquele segundo a opinião dos provadores, melhor pontuado. Quando se questionaram os provadores quanto à sua intenção de compra de produtos semelhantes 48% dos inquiridos revela que não compraria um produto semelhante e 38% revela que compraria um produto semelhante.

E) Power Bubble com *Chlorella vulgaris*

Tal como na aplicação da *Chlorella vulgaris* em *frushape* a avaliação dos parâmetros físico-químicos fez-se em duas partes distintas. Na primeira parte foram avaliadas as *Power Bubble* propriamente ditas em relação apenas aos parâmetros de cor, já que a evolução destes era essencial para compreender o comportamento (ao longo do tempo) da microalga quando aplicada numa matriz alimentar. Foram também quantificados os valores dos parâmetros de pH e brix. Numa segunda parte, foi possível analisar não só os parâmetros de cor ao longo do tempo (que permitiram verificar se existia migração de cor das *Power Bubble* para o preparado e consequentemente avaliar o poder corante da microalga), como também os valores de pH e brix a fim de dar indicações sobre o estado do produto.

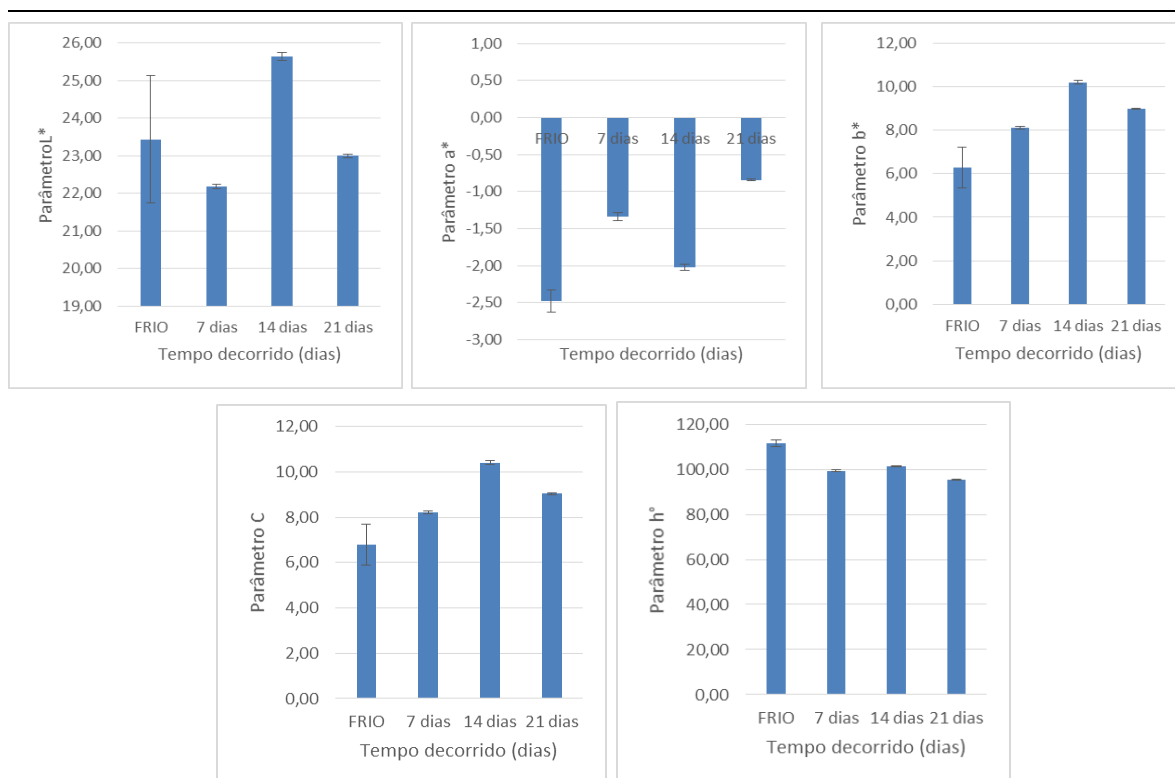


Figura 32 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° das *Power Bubble* com *Chlorella vulgaris* ao longo de 21 dias de amostragem

Com a análise da evolução dos parâmetros de cor (representados na figura 32), verificou-se que para os parâmetros L*, a*, b* e C regista-se um ligeiro aumento quando observa o dia 14 de amostragem. Estatisticamente existem diferenças para cada parâmetro quando comparados os dias de amostragem isto porque em todos os casos o valor de p é inferior a 0,05 (os resultados encontram-se expressos na tabela 72).

Através da análise da figura 33, onde se encontram representados os parâmetros físico-químicos das *Power bubble* com *Chlorella vulgaris*, é possível verificar que os valores de pH e Brix sofrem, no caso do pH um descido acentuado e contrariamente no caso do brix um aumento bastante acentuada a partir do dia 7 de amostragem. Esta descida pode ser explicada pela adição das *Power bubble* à calda de conservação, isto porque a tendência é que ocorreram transferências entre os dois meios até se atingir o equilíbrio.

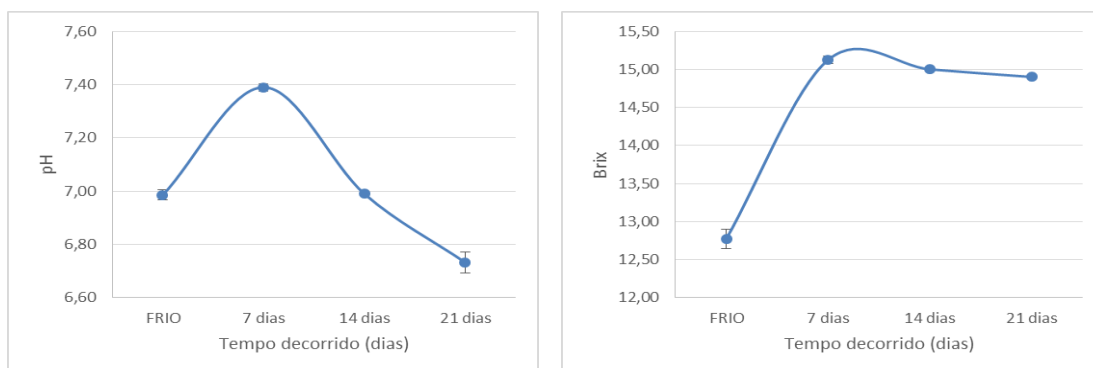


Figura 33 - Variações dos parâmetros de pH e °Brix das *Power Bubble* com *Chlorella vulgaris* ao longo de 21 dias de amostragem

Com a análise da evolução dos parâmetros de cor (representados na figura 34), verificou-se que para os parâmetros L*, a*, b*, C e h registam-se ligeiras diferenças, o que pode indicar a migração de cor desde o centro das *Power Bubble* para a calda de conservação. Estatisticamente existem diferenças para cada parâmetro quando comparados os dias de amostragem isto porque em todos os casos o valor de p é inferior a 0,05 (os resultados encontram-se expressos na tabela 73).

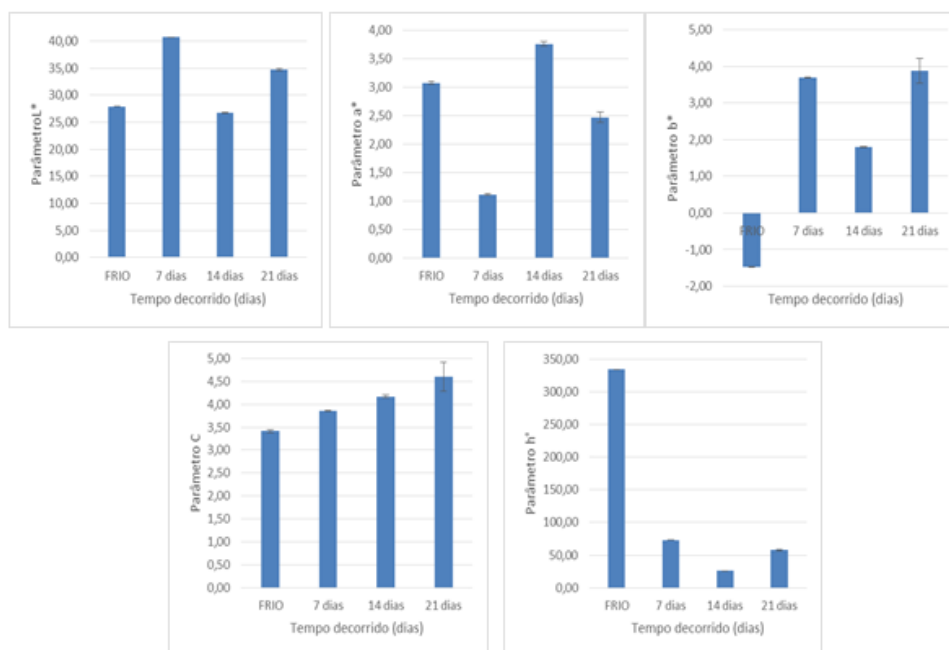


Figura 34 - Variações dos parâmetros de L*, a*, b*, C e h° da calda de conservação das *Power Bubble* com *Chlorella vulgaris* ao longo de 21 dias de amostragem

Através da análise da figura 35, onde se encontram representados os parâmetros físico-químicos da calda de conservação das *Power bubble* com *Chlorella vulgaris*, é possível verificar, tal como tinha acontecido para as *Power bubble* que os valores de pH e Brix sofrem uma descida acentuada, neste caso desde a sua preparação. Esta descida pode ser explicada pela adição das *Power bubble* à calda de conservação, sendo que a tendência é que ocorreram transferências entre os dois meios até se atingir o equilíbrio.

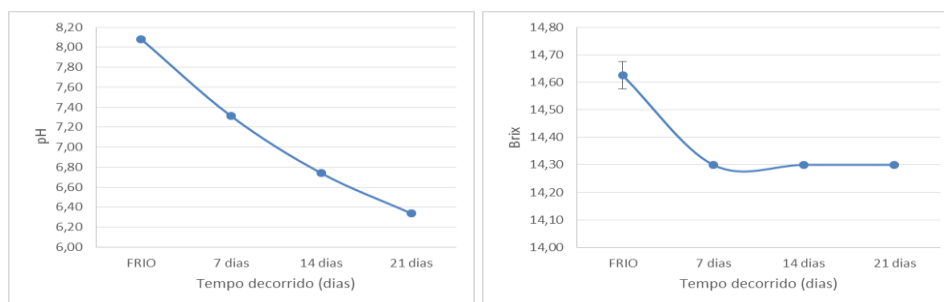


Figura 35 - Variações de pH e brix da calda de conservação das *Power Bubble* para 21 dias de amostragem

A análise sensorial das *Power bubble* forneceu importantes indicações, já que através das conclusões retiradas é possível ter uma perspetiva de como o produto poderá ser aceite pelo consumidor final. Neste caso, apenas os parâmetros “Aparência geral” e “Cor” foram pontuados positivamente já que os valores obtidos foram superiores à média. O parâmetro “Cor” foi aquele segundo a opinião dos provadores, melhor pontuado. Quando se questionaram os provadores quanto à sua intenção de compra de produtos semelhantes 86% dos inquiridos revela que não compraria um produto semelhante e apenas 5% revela que compraria um produto semelhante. O que leva a concluir, mais uma vez que em bases doces a aplicação da microalga não é apelativa organoleticamente, isto porque apesar da quantidade adicionada ser reduzida o sabor a mar é bastante intenso e consegue sobrepor-se aos restantes.

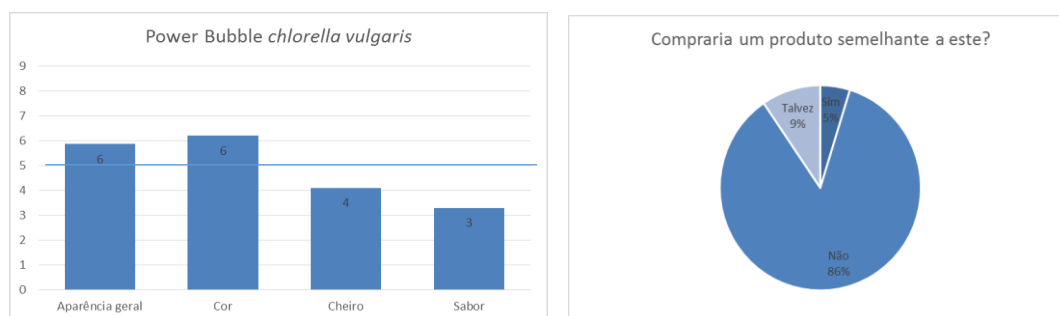


Figura 36 - Testes de aceitabilidade. Caracterização do produto (esq.), opção de compra (dir.)

5. CONCLUSÕES GERAIS

Em suma, é possível dizer que tanto a concentração como a temperatura influenciam negativamente a cor das soluções que na sua composição possuam a microalga *Chlorella vulgaris*. Quando aplicadas temperaturas mais elevadas que a temperatura ambiente, verifica-se a conversão da clorofila (presente na microalga) no composto que confere cor verde azeitona às soluções. Também o pH é um fator externo que afeta fortemente a cor de soluções com a microalga na sua composição. Assim, a aplicação em matrizes alimentares apenas será positiva (em termos visuais), quando se tratarem de produtos cujo pH se aproxima da neutralidade e cujos tratamentos térmicos que o originam não se mostram demasiado agressivos e portanto não contribuem para a alteração da sua estrutura.

Relativamente à adição de *Spirulina* em combinação com a microalga *Chlorella* não se registou qualquer vantagem a nível de preservação da cor das soluções. Para além das dificuldades na homogeneização, foi possível verificar que ocorre uma rápida sedimentação deste componente, originando claras diferenças de fases, o que do ponto de vista do consumidor pode ser percebido como negativo.

Do ponto de vista sensorial, verificou-se que quanto maior a concentração da microalga no produto final, mais intenso será o sabor a mar e portanto menos apelativo (organoleticamente) será para o consumidor. Uma alternativa será a sua incorporação em bases salgadas, que segundo os provadores será melhor aceite pelo consumidor.

Como perspetivas de trabalho futuro é sugerível que a dosificação da microalga em preparados se mantenha nos 2 %, a aplicação desta microalga em preparados salgados também poderá ser mantida já que é aquela que segundo os provadores poderá ser mais apelativa organoleticamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andres-Bello, A., V. Barreto-Palacios, P. Garcia-Segovia, J. Mir-Bel, and J. Martinez-Monzo, 2013, Effect of pH on Color and Texture of Food Products: Food Engineering Reviews, v. 5, p. 158-170.

Becker, E. W., 2007, Micro-algae as a source of protein: Biotechnology Advances, v. 25, p. 207-210.

Bewicke, D., and B. Potter, 2009, Chlorella: The Emerald Food, Ronin Publishing.

Chacon-Lee, T. L., and G. E. Gonzalez-Marino, 2010, Microalgae for "Healthy" Foods- Possibilities and Challenges: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 9, p. 655-675.

Cho, S., S. Cho, and G. C. Fahey, 2011, RFI's Chlorella vulgaris GRAS Self affirmation, Division of Biotechnology and GRAS Notice Review - US FDA.

Committee, I. T., 1985, International Standard ISO 6658, ISO.

Dicionários, D. d., 2013, Dicionário da Língua Portuguesa, in L. Porto Editora, ed., Porto, p. 76.

Global New Products Database, Mintel, 2014

Harun, R., M. Singh, G. M. Forde, and M. K. Danquah, 2010, Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products: Renewable & Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 1037-1047.

Kanno, T., 2005, *Chlorella Vulgaris and Chlorella Vulgaris Extract (CVE): The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier*, Woodland Publishing, Incorporated.

Koca, N., F. Karadeniz, and H. S. Burdurlu, 2007, Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas: *Food Chemistry*, v. 100, p. 609-615.

Lawless, H. T., and H. Heymann, 2010, *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*, Springer.

Lee, W., W. H. Lee, and M. Rosenbaum, 1998, *Chlorella*, McGraw-Hill Education.

Pathare, P. B., U. L. Opara, and F. A. Al-Said, 2013, Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review: *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 36-60.

Posten, C., and C. Walter, 2012, *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*, Walter de Gruyter, p. 13-15.

Priyadarshani, I., and B. Rath, 2012, Commercial and industrial applications of micro algae – A review *Journal of Algal Biomass Utilization*, Department of Biotechnology, North Orissa University, p. 89–100.

Pulz, O., and W. Gross, 2004, Valuable products from biotechnology of microalgae: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, p. 635-648.

Rao, M. A., 2007, *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications* Washington State University, Department of Food Science & Technology, p. 481.

Richmond, A., 2008, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Wiley.

Schwartz, S. J., and T. V. Lorenzo, 1990, CHLOROPHYLLS IN FOODS: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 29, p. 1-17.

Somogyi, L. P.; Ramaswamy, H. S.; Hui, Y. H. (ed); “Biology, Principles, and Applications”; Volume 1; Technomic Publishing Company , Pennsylvania; 1996;

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, 2006, Commercial applications of microalgae: Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, p. 87-96.

Toshihiro Kanno, P. D., 2005, Chlorella Vulgaris and Chlorella Vulgaris Extract (CVE):

Varfolomeev, S. D., and L. A. Wasserman, 2011, Microalgae as Source of Biofuel, Food, Fodder, and Medicines: Applied Biochemistry and Microbiology, v. 47, p. 789-807.

CIBERGRAFIA

European Commission – “Health and Consumers: Food” - consultado a 25/09/2014

http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/nfnetweb/mod_search/index.cfm?s_eqfce=103&verify=&action=mod_search.details&fldProdNam=Chlorella+vulgaris

Food and Drug Administration – GRAS Chlorella vulgaris -_consultado a 25/09/2014

<http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm277773.pdf>

APÊNDICES

APÊNDICE I – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Figura 37 - Equipamentos utilizados para medição dos parâmetros: Refratômetro, Potenciômetro, Colorímetro portátil e viscosímetro de Bostwick.

APÊNDICE II - Efeito da temperatura e concentração na cor final de soluções com *Chlorella vulgaris*

Tabela 20 - Médias parâmetros de cor (L*, a*, b*, C e h°) de soluções *Chlorella vulgaris* - dia 0

Concentração microalga	Binômios	L*	a*	b*	C	h°
1,5 %	T. ambiente	19,13	-2,37	4,11	4,75	119,78
1,5 %	85 °C, 10 minutos	21,63	1,03	8,88	8,94	82,24
1,5 %	90 °C, 5 minutos	23,60	0,64	9,82	9,89	85,36
1,5 %	95 °C, 5 minutos	22,01	1,34	9,18	9,28	81,67
1 %	T. ambiente	21,02	-1,64	8,00	8,17	101,58
1 %	85 °C, 10 minutos	20,65	1,10	7,59	7,66	81,72
1 %	90 °C, 5 minutos	20,85	1,40	7,55	7,69	79,35
1 %	95 °C, 5 minutos	21,14	1,37	8,05	8,17	80,30
0,5 %	T. ambiente	19,21	-0,24	6,04	6,04	92,25
0,5 %	85 °C, 10 minutos	20,41	-0,43	6,45	6,47	93,78
0,5 %	90 °C, 5 minutos	20,55	0,69	6,53	6,57	83,90
0,5 %	95 °C, 5 minutos	20,69	0,60	6,89	6,92	85,01
1,5 % sem açúcar	85 °C, 10 minutos	22,75	-0,47	11,09	11,10	92,42
1,5 % sem açúcar	90 °C, 5 minutos	23,87	-0,32	11,72	11,71	91,58
1,5 % sem açúcar	95 °C, 5 minutos	23,44	0,17	11,60	11,60	89,17

Tabela 21 - Valores de p obtidos a partir do teste ANOVA para os diferentes dias de amostragem das soluções de *Chlorella vulgaris* (resultados de todos os dias de amostragem)

Parâmetro	Valor p (dia 0)	Valor p (dia 3)	Valor p (dia 5)
L*	$4,24 \times 10^{-8}$	$1,80 \times 10^{-15}$	$2,87 \times 10^{-16}$
a*	$2,21 \times 10^{-14}$	$3,77 \times 10^{-24}$	$2,98 \times 10^{-23}$
b*	$1,24 \times 10^{-14}$	$6,36 \times 10^{-29}$	$6,69 \times 10^{-29}$
C	$3,02 \times 10^{-14}$	$2,88 \times 10^{-26}$	$2,57 \times 10^{-26}$
h°	$1,27 \times 10^{-18}$	$1,90 \times 10^{-6}$	$8,17 \times 10^{-23}$

Tabela 22 - Médias parâmetros de cor (L*, a*, b*, C e h°) de soluções *Chlorella vulgaris* - dia 2

Concentração microalga	Binômios	L*	a*	b*	C	h°
1,5 %	T. ambiente	19,13	-2,37	4,11	4,75	119,78
1,5 %	85 °C, 10 minutos	23,25	0,91	9,75	9,80	84,66
1,5 %	90 °C, 5 minutos	23,43	1,29	9,67	9,75	82,41
1,5 %	95 °C, 5 minutos	23,31	1,35	10,16	10,25	82,43
1 %	T. ambiente	21,02	-1,64	8,00	8,17	101,58
1 %	85 °C, 10 minutos	22,93	-0,10	8,96	8,96	90,63
1 %	90 °C, 5 minutos	21,26	1,43	7,80	7,93	79,62
1 %	95 °C, 5 minutos	21,45	1,40	8,14	8,26	80,23
0,5 %	T. ambiente	19,21	-0,24	6,04	6,04	92,25
0,5 %	85 °C, 10 minutos	20,14	0,04	6,11	6,11	89,64
0,5 %	90 °C, 5 minutos	20,85	0,63	6,63	6,66	84,60
0,5 %	95 °C, 5 minutos	20,49	0,82	6,54	6,59	82,90
1,5 % sem açúcar	85 °C, 10 minutos	23,15	-0,22	11,19	11,20	91,13
1,5 % sem açúcar	90 °C, 5 minutos	23,38	0,04	11,41	11,41	89,79
1,5 % sem açúcar	95 °C, 5 minutos	23,54	0,29	11,36	11,36	88,54

Tabela 23 - Médias parâmetros de cor (L*, a*, b*, C e h°) de soluções *Chlorella vulgaris* - dia 5

Concentração microalga	Binômios	L*	a*	b*	C	h°
1,5 %	T. ambiente	19,13	-2,37	4,11	4,75	119,78
1,5 %	85 °C, 10 minutos	20,42	0,03	6,07	6,07	87,37
1,5 %	90 °C, 5 minutos	20,71	0,64	6,55	6,58	84,38
1,5 %	95 °C, 5 minutos	21,02	0,60	6,47	6,50	84,63
1 %	T. ambiente	21,02	-1,64	8,00	8,17	101,58
1 %	85 °C, 10 minutos	23,25	0,72	8,59	8,62	85,21
1 %	90 °C, 5 minutos	21,82	1,17	8,41	8,49	82,05
1 %	95 °C, 5 minutos	21,61	1,31	8,14	8,25	80,82
0,5 %	T. ambiente	19,21	-0,24	6,04	6,04	92,25
0,5 %	85 °C, 10 minutos	23,53	0,22	9,84	9,84	88,75
0,5 %	90 °C, 5 minutos	23,19	1,24	9,36	9,44	82,45
0,5 %	95 °C, 5 minutos	24,14	1,28	9,26	9,34	82,14
1,5 % sem açúcar	85 °C, 10 minutos	23,36	-0,17	11,32	11,33	90,86
1,5 % sem açúcar	90 °C, 5 minutos	23,50	0,11	11,37	11,37	89,45
1,5 % sem açúcar	95 °C, 5 minutos	23,83	0,16	11,70	11,70	89,23

APÊNDICE III – Efeito do pH na cor de soluções com *Chlorella vulgaris* (Soluções tampão)

Tabela 24 - Médias parâmetros de cor de soluções tampão de citrato-fosfato após preparação

pH	L*	a*	b*	C	h°
2,77	13,71	7,57	-1,15	7,66	351,39
3,23	16,29	5,41	-1,69	5,67	342,74
3,70	17,68	4,65	-1,64	4,93	340,63
4,19	13,45	6,32	-2,89	6,95	335,46
4,31	13,71	5,96	-2,43	6,44	337,82
4,55	13,62	5,91	-2,51	6,42	336,97
5,46	15,12	5,06	-2,75	5,76	331,50

Tabela 25 - Médias parâmetros de cor de soluções tampão de citrato-fosfato após 24 horas

pH	L*	a*	b*	C	h°
2,77	15,28	8,31	0,85	8,36	5,82
3,23	12,10	8,57	-3,59	9,29	337,29
3,70	13,89	6,89	-0,78	6,92	353,38
4,19	13,65	6,90	-1,85	7,14	345,02
4,31	14,67	6,60	-1,63	6,79	346,60
4,55	14,96	5,80	-1,24	5,93	348,06
5,46	13,79	6,05	-2,63	6,59	336,51

Tabela 26 - Médias parâmetros de cor de soluções tampão de citrato-fosfato após 24 horas e posterior pasteurização

pH	L*	a*	b*	C	h°
2,77	18,59	8,89	6,76	11,17	37,27
3,23	13,96	9,05	-0,96	9,10	353,93
3,70	15,46	6,60	-0,70	6,64	353,96
4,19	16,72	7,16	2,77	7,68	21,15
4,31	14,66	7,42	-0,38	7,43	357,06
4,55	14,93	6,50	-0,15	6,51	358,67
5,46	14,11	7,18	-1,33	7,30	349,55

Tabela 27 - Valores de p obtidos a partir do teste ANOVA para as diferentes soluções tampão com *Chlorella vulgaris* (o teste diz respeito aos 3 dias de amostragem)

Parâmetro	Valor p - 1	Valor p - 2	Valor p - 3
L*	$4,98 \times 10^{-16}$	$2,11 \times 10^{-16}$	$3,06 \times 10^{-32}$
a*	$2,18 \times 10^{-16}$	$3,29 \times 10^{-14}$	$5,08 \times 10^{-25}$
b*	$8,14 \times 10^{-19}$	$2,26 \times 10^{-22}$	$9,53 \times 10^{-35}$
C	$2,91 \times 10^{-15}$	$2,55 \times 10^{-14}$	$1,76 \times 10^{-29}$
h°	$2,33 \times 10^{-21}$	$1,70 \times 10^{-48}$	$1,55 \times 10^{-53}$

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	G_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2	G_2	A_3	B_3	C_3	D_3	E_3	F_3	G_3
A_1		0,000 162	0,000 162	0,932 298	1,000 000	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,997 132	1,000 000	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 162	0,920 175	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,261 578
B_1	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 166	0,147 871	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_1	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
D_1	0,932 298	0,000 162	0,000 162		0,932 298	0,999 476	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,135 349	0,994 562	0,000 162	0,000 162	0,594 742	0,000 162	0,033 538	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
E_1	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,932 298		1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,997 132	1,000 000	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 162	0,920 175	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
F_1	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,999 476	1,000 000		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,866 942	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,999 356	0,000 162	0,526 570	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,054 061
G_1	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,999 476	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,107 727	0,999 803	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,540 163	0,000 162	0,089 129	0,997 132	0,000 162
A_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,999 476		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,002 643	0,867 457	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,998 598	0,000 162	0,002 071	0,486 160	0,000 162
B_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_2	0,997 132	0,000 162	0,000 162	0,135 349	0,997 132	0,866 942	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,952 632	0,000 195	0,000 162	0,999 999	0,000 162	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 205	0,000 162	0,987 445
D_2	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,994 562	1,000 000	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,952 632		0,000 162	0,000 162	0,999 973	0,000 162	0,701 347	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,102 800
E_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,107 727	0,002 643	0,000 162	0,000 195	0,000 162		0,770 155	0,000 162	0,000 162	0,000 400	0,000 182	0,000 162	1,000 000	0,899 433	0,010 713
F_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,999 803	0,867 457	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,770 155		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,044 792	0,000 162	0,721 665	1,000 000	0,000 163
G_2	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,594 742	1,000 000	0,999 356	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,999 973	0,999 973	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,998 598	0,000 162	0,000 162	0,000 163	0,000 162	0,662 162
A_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_3	0,920 175	0,000 162	0,000 162	0,033 538	0,920 175	0,526 570	0,000 162	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,701 347	0,000 400	0,000 162	0,998 598	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 487	0,000 162	0,999 938
C_3	0,000 162	0,000 166	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,540 163	0,998 598	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 182	0,044 792	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 171	0,021 517	0,000 162
D_3	0,000 162	0,147 871	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
E_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,089 129	0,002 071	0,000 162	0,000 205	0,000 162	1,000 000	0,721 665	0,000 163	0,000 162	0,000 487	0,000 171	0,000 162		0,866 942	0,013 556
F_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,997 132	0,486 160	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,899 433	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,021 517	0,000 162	0,866 942		0,000 167
G_3	0,261 578	0,000 162	0,000 162	0,001 147	0,261 578	0,054 061	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,987 445	0,102 800	0,010 713	0,000 163	0,662 162	0,000 162	0,999 938	0,000 162	0,000 162	0,013 556	0,000 167	

Figura 38 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com *Chlorella vulgaris* - parâmetro L*

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	G_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2	G_2	A_3	B_3	C_3	D_3	E_3	F_3	G_3
A_1		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 168	0,000 179	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,051 345	0,998 392	0,000 162	0,078 441
B_1	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,001 029	0,004 652	0,206 152	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,078 441	0,000 210	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_1	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,042 529	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
D_1	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,160 721	0,048 243	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 648	0,000 482	0,566 833	0,002 582	0,615 697	0,000 162	0,000 162	0,583 151	0,000 162	0,000 162	0,983 378	0,000 162
E_1	0,000 162	0,001 029	0,000 162	0,160 721		1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 199	0,996 991	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 203	0,000 162	0,000 162	0,001 262	0,000 162
F_1	0,000 162	0,004 652	0,000 162	0,048 243	1,000 000		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 166	0,999 992	0,999 505	0,000 162	0,000 162	0,000 166	0,000 162	0,000 162	0,000 349	0,000 162
G_1	0,000 162	0,206 152	0,042 529	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
A_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,710 429	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 509	0,000 163	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,710 429		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,350 139	0,009 587	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_2	0,000 168	0,000 162	0,000 162	0,000 648	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		1,000 000	0,550 520	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,534 244	0,631 861	0,001 672	0,093 313	0,518 029
D_2	0,000 179	0,000 162	0,000 162	0,000 482	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	1,000 000		0,470 014	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,454 300	0,710 429	0,002 400	0,069 642	0,599 448
E_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,566 833	0,000 199	0,000 166	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,550 520	0,470 014		0,000 162	0,000 836	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 836	0,000 162	0,999 996	0,000 545
F_2	0,000 162	0,078 441	0,000 162	0,002 582	0,996 991	0,999 992	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,809 043	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 165	0,000 162
G_2	0,000 162	0,000 210	0,000 162	0,615 697	1,000 000	0,999 505	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 836	0,809 043		0,000 162	0,000 162	0,000 902	0,000 162	0,000 162	0,014 637	0,000 162
A_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 509	0,350 139	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,997 537	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 163	0,000 587	0,009 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,997 537		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,583 151	0,000 203	0,000 166	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,534 244	0,454 300	1,000 000	0,000 162	0,000 902	0,000 162	0,000 162		0,000 785	0,000 162	0,999 998	0,000 509
D_3	0,051 345	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,631 861	0,710 429	0,000 836	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 785		0,710 429	0,000 186	1,000 000
E_3	0,998 392	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,001 672	0,002 400	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 429	0,710 429	0,000 162	0,809 043
F_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,983 378	0,001 262	0,000 349	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,093 313	0,069 642	0,999 996	0,000 165	0,014 637	0,000 162	0,000 162	0,999 998	0,000 186	0,000 162		0,000 171
G_3	0,078 441	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,518 029	0,599 448	0,000 545	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 509	1,000 000	0,809 043	0,000 171	

Figura 39 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com *Chlorella vulgaris* - parâmetro a*

Apêndices

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	G_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2	G_2	A_3	B_3	C_3	D_3	E_3	F_3	G_3	
A_1		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 191	0,000 162	0,000 162	0,997 513	0,000 162	0,000 162	0,272 518	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,366 086
B_1	0,000 162		1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,559 330	0,999 990	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 205
C_1	0,000 162	1,000 000		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,123 868	1,000 000	0,000 164	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,001 041
D_1	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 171	0,783 709	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,015 424	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
E_1	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,999 511	0,000 726	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,179 450	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
F_1	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 171	0,999 511		0,034 664	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,914 847	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
G_1	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,783 709	0,000 726	0,034 664		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,940 118	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
A_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_2	0,000 191	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,341 249	0,998 856	0,000 162	0,000 164	0,000 162	0,000 162	0,000 162
D_2	0,000 162	0,559 330	0,123 868	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,083 121	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
E_2	0,000 162	0,999 990	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,083 121		0,000 166	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,001 704
F_2	0,997 513	0,000 162	0,000 164	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 166		0,000 162	0,000 162	0,006 221	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,996 463
G_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,015 424	0,179 450	0,914 847	0,940 118	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
A_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_3	0,272 518	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,341 249	0,000 162	0,000 162	0,006 221	0,000 162	0,000 162		0,011 734	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 195
C_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,998 856	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,011 734		0,000 162	0,000 817	0,000 162	0,000 162	0,000 162
D_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
E_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 164	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 817	0,000 162	0,000 162		0,048 633	0,000 162	0,000 162
F_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,048 633		0,000 162	0,000 162
G_3	0,366 086	0,000 205	0,001 041	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,001 704	0,996 463	0,000 162	0,000 162	0,000 195	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162

Figura 40 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com *Chlorella vulgaris* - parâmetro C

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	G_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2	G_2	A_3	B_3	C_3	D_3	E_3	F_3	G_3
A_1		0,000 162	0,000 162	0,000 181	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 187	0,000 162	0,000 167	0,007 068	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,926 277	0,000 162	0,247 711
B_1	0,000 162		0,000 166	0,000 162	0,000 163	0,000 164	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,776 663	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_1	0,000 162	0,000 166		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
D_1	0,000 181	0,000 162	0,000 162		0,008 656	0,005 380	0,000 162	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,982 960	0,998 379	0,000 162	0,269 524	0,000 162	0,000 162	0,497 687	0,000 168	0,016 747	0,050 813	0,292 641
E_1	0,000 162	0,000 163	0,000 162	0,008 656		1,000 000	0,000 205	0,000 162	0,000 162	0,016 747	0,000 185	0,304 574	0,008 656	0,999 148	0,000 162	0,000 162	0,982 960	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 162
F_1	0,000 162	0,000 164	0,000 162	0,005 380	1,000 000		0,000 236	0,000 162	0,000 162	0,010 573	0,000 171	0,227 120	0,013 765	0,996 483	0,000 162	0,000 162	0,959 799	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 162
G_1	0,000 162	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 205	0,000 236		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,995 780	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 165	0,000 162
A_2	0,000 187	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 166	0,000 162	0,000 205	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,982 960	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_2	0,000 167	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,016 747	0,010 573	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,944 820	0,999 847	0,000 162	0,395 764	0,000 162	0,000 162	0,649 807	0,000 164	0,008 656	0,089 199	0,189 615
D_2	0,007 068	0,000 162	0,000 162	0,982 960	0,000 185	0,000 171	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,944 820		0,269 524	0,000 162	0,002 701	0,000 162	0,000 162	0,008 656	0,004 085	0,649 807	0,000 360	0,998 941
E_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,998 379	0,304 574	0,227 120	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,999 847	0,269 524		0,000 162	0,982 960	0,000 162	0,000 162	0,999 148	0,000 162	0,000 307	0,708 464	0,008 094
F_2	0,000 162	0,776 663	0,000 162	0,000 162	0,008 656	0,013 765	0,995 780	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 242	0,000 162	0,000 162	0,000 185	0,000 162	0,000 162	0,001 288	0,000 162
G_2	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,269 524	0,999 148	0,996 483	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,395 764	0,002 701	0,982 960	0,000 242		0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 162	0,000 162	1,000 000	0,000 184
A_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
B_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 166	0,982 960	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162
C_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,497 687	0,982 960	0,959 799	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,649 807	0,008 656	0,999 148	0,000 185	1,000 000	0,000 162	0,000 162		0,000 162	0,000 162	0,999 952	0,000 236
D_3	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,000 168	0,000 162	0,000 162	0,000 205	0,000 162	0,000 162	0,000 164	0,004 085	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162		0,858 059	0,000 162	0,172 667
E_3	0,926 277	0,000 162	0,000 162	0,016 747	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,008 656	0,649 807	0,000 307	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,858 059		0,000 162	0,999 884
F_3	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,050 813	1,000 000	1,000 000	0,000 165	0,000 162	0,000 162	0,089 199	0,000 360	0,708 464	0,001 288	1,000 000	0,000 162	0,000 162	0,999 952	0,000 162	0,000 162		0,000 162
G_3	0,247 711	0,000 162	0,000 162	0,292 641	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,000 162	0,189 615	0,998 941	0,008 094	0,000 162	0,000 184	0,000 162	0,000 162	0,000 236	0,172 667	0,999 884	0,000 162	

Figura 41 - Teste Tukey HSD realizado para as soluções tampão com *Chlorella vulgaris* - parâmetro h°

APÊNDICE IV – EFEITO pH NA COR (SOLUÇÕES ACIDIFICADAS DE *SPIRULINA*; SOLUÇÕES *SPIRULINA/CHLORELLA*; PREPARADO *CHLORELLA VULGARIS*)

Tabela 28 – Médias parâmetros de cor de soluções acidificadas de *Spirulina* spp antes e após pasteurização

pH	L*	a*	b*	C	h°
9,08 – Antes pasteurização	13,92	4,27	-1,28	4,46	343,36
4,64 – Antes pasteurização	12,78	4,74	-4,08	6,25	319,24
3,44 – Antes pasteurização	18,43	2,22	-0,82	2,37	339,80
9,08 – Após pasteurização	14,16	4,34	-1,60	4,63	339,84
4,64 – Após pasteurização	15,61	5,07	-0,62	5,11	353,09
3,44 – Após pasteurização	17,23	4,12	-0,24	4,13	352,93

Tabela 29 - Médias parâmetros de cor soluções de *Spirulina*. e *Chlorella* antes/após pasteurização

pH	L*	a*	b*	C	h°
8,84– Antes pasteurização	12,66	4,78	-2,27	5,30	334,57
4,58– Antes pasteurização	13,56	4,90	-1,65	5,18	341,30
4,32– Antes pasteurização	17,53	1,70	0,65	1,87	29,58
8,84– Após pasteurização	14,83	1,26	0,10	1,26	3,91
4,58– Após pasteurização	17,05	4,11	3,40	5,30	39,28
4,32– Após pasteurização	15,92	4,81	1,58	5,08	17,87

Tabela 30 - Médias parâmetros de cor do preparado com *Chlorella vulgaris* antes/após pasteurização

pH	L*	a*	b*	C	h°
Controlo – Antes pasteurização	24,33	-4,07	8,05	9,02	116,76
6,95 – Antes pasteurização	25,37	-3,70	6,75	7,72	119,21
5,67 – Antes pasteurização	23,89	-3,79	7,81	8,68	115,80
4,21 – Antes pasteurização	24,92	-0,46	8,95	8,96	92,93
3,24 – Antes pasteurização	32,34	-0,82	13,73	13,76	93,37
2,67 – Antes pasteurização	28,95	1,14	11,75	11,80	84,45
Controlo – Após pasteurização	23,78	-2,38	7,70	8,06	107,17
6,95 – Após pasteurização	24,87	-2,33	7,44	7,79	107,36
5,67 – Após pasteurização	25,02	1,41	8,38	8,50	80,42
4,21 – Após pasteurização	28,02	2,47	7,64	8,03	71,91
3,24 – Após pasteurização	31,11	1,71	11,40	11,53	81,41
2,67 – Após pasteurização	27,02	2,79	6,95	7,50	68,18

Tabela 31 - Valor de p de cada parâmetro de cor obtido através do teste ANOVA para as soluções de *Spirulina* spp.

Parâmetro	Valor p – Antes pasteurização	Valor p – Após pasteurização
L*	$1,88 \times 10^{-5}$	$6,93 \times 10^{-4}$
a*	$6,77 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-2}$
b*	$3,81 \times 10^{-4}$	$2,32 \times 10^{-2}$
C	$4,26 \times 10^{-4}$	$1,44 \times 10^{-2}$
h°	$1,16 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-5}$

Tabela 32 - Resultados teste Tukey para parâmetro L* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Spirulina* spp.

	9,08 AP	4,64 AP	3,44 AP	9,08 AT	4,64 AT	3,44 AT
9,08 AP		0,001071	0,000249	0,498062	0,000294	0,000249
4,64 AP	0,001071		0,000249	0,000485	0,000249	0,000249
3,44 AP	0,000249	0,000249		0,000249	0,000249	0,000848
9,08 AT	0,498062	0,000485	0,000249		0,000413	0,000249
4,64 AT	0,000294	0,000249	0,000249	0,000413		0,000313

Tabela 33 - Resultados teste Tukey para parâmetro a* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Spirulina* spp.

	9,08 AP	4,64 AP	3,44 AP	9,08 AT	4,64 AT	3,44 AT
9,08 AP		0,081821	0,000258	0,992866	0,007409	0,839925
4,64 AP	0,081821		0,000249	0,146695	0,263427	0,024358
3,44 AP	0,000258	0,000249		0,000255	0,000249	0,000269
9,08 AT	0,992866	0,146695	0,000255		0,011656	0,581930
4,64 AT	0,007409	0,263427	0,000249	0,011656		0,003021

Tabela 34 - Resultados teste Tukey para parâmetro b* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Spirulina* spp.

	9,08 AP	4,64 AP	3,44 AP	9,08 AT	4,64 AT	3,44 AT
9,08 AP		0,000273	0,318898	0,639527	0,102248	0,014666
4,64 AP	0,000273		0,000253	0,000321	0,000251	0,000249
3,44 AP	0,318898	0,000253		0,056133	0,894043	0,159867
9,08 AT	0,639527	0,000321	0,056133		0,019885	0,003949
4,64 AT	0,102248	0,000251	0,894043	0,019885		0,479668

Tabela 35 - Resultados teste Tukey para parâmetro C (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Spirulina* spp.

	9,08 AP	4,64 AP	3,44 AP	9,08 AT	4,64 AT	3,44 AT
9,08 AP		0,000391	0,000286	0,870272	0,041434	0,387835
4,64 AP	0,000391		0,000249	0,000538	0,002741	0,000282
3,44 AP	0,000286	0,000249		0,000266	0,000250	0,000406
9,08 AT	0,870272	0,000538	0,000266		0,135196	0,117165
4,64 AT	0,041434	0,002741	0,000250	0,135196		0,005920

Tabela 36 - Resultados teste Tukey para parâmetro h° (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Spirulina* spp.

	9,08 AP	4,64 AP	3,44 AP	9,08 AT	4,64 AT	3,44 AT
9,08 AP		0,000249	0,125249	0,130285	0,001234	0,001335
4,64 AP	0,000249		0,000250	0,000250	0,000249	0,000249
3,44 AP	0,125249	0,000250		1,000000	0,000370	0,000381
9,08 AT	0,130285	0,000250	1,000000		0,000373	0,000384
4,64 AT	0,001234	0,000249	0,000370	0,000373		0,999987

Tabela 37 - Valor de p parâmetros de cor obtidos através do teste ANOVA para as soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

Parâmetro	Valor p – Antes pasteurização	Valor p – Após pasteurização
L*	$2,46 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-16}$
a*	$3,91 \times 10^{-10}$	$1,75 \times 10^{-13}$
b*	$4,08 \times 10^{-8}$	$1,36 \times 10^{-13}$
C	$1,61 \times 10^{-12}$	$9,77 \times 10^{-15}$
h°	$2,64 \times 10^{-23}$	$1,17 \times 10^{-11}$

Tabela 38 - Resultados teste Tukey para parâmetro L* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

	8,84 AP	4,58 AP	4,32 AP	8,84 AT	4,58 AT	4,32 AT
8,84 AP		0,011486	0,000157	0,000157	0,000157	0,000157
4,58 AP	0,011486		0,000157	0,000481	0,000157	0,000157
4,32 AP	0,000157	0,000157		0,000157	0,329308	0,000168
8,84 AT	0,000157	0,000481	0,000157		0,000157	0,001992
4,58 AT	0,000157	0,000157	0,329308	0,000157		0,001386

Tabela 39 - Resultados teste Tukey para parâmetro a* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

	8,84 AP	4,58 AP	4,32 AP	8,84 AT	4,58 AT	4,32 AT
8,84 AP		0,716592	0,000157	0,000157	0,000158	0,999796
4,58 AP	0,716592		0,000157	0,000157	0,000157	0,853184
4,32 AP	0,000157	0,000157		0,000844	0,000157	0,000157
8,84 AT	0,000157	0,000157	0,000844		0,000157	0,000157
4,58 AT	0,000158	0,000157	0,000157	0,000157		0,000158

Tabela 40 - Resultados teste Tukey para parâmetro b* (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

	8,84 AP	4,58 AP	4,32 AP	8,84 AT	4,58 AT	4,32 AT
8,84 AP		0,000553	0,000157	0,000157	0,000157	0,000157
4,58 AP	0,000553		0,000157	0,000157	0,000157	0,000157
4,32 AP	0,000157	0,000157		0,001739	0,000157	0,000158
8,84 AT	0,000157	0,000157	0,001739		0,000157	0,000157
4,58 AT	0,000157	0,000157	0,000157	0,000157		0,000157

Tabela 41 - Resultados teste Tukey para parâmetro C (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

	8,84 AP	4,58 AP	4,32 AP	8,84 AT	4,58 AT	4,32 AT
8,84 AP		0,219570	0,000157	0,000157	1,000000	0,005857
4,58 AP	0,219570		0,000157	0,000157	0,219570	0,457885
4,32 AP	0,000157	0,000157		0,000157	0,000157	0,000157
8,84 AT	0,000157	0,000157	0,000157		0,000157	0,000157
4,58 AT	1,000000	0,219570	0,000157	0,000157		0,005857

Tabela 42 - Resultados teste Tukey para parâmetro h° (AP-Antes pasteurização; AT-Após pasteurização) de soluções de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* spp.

	8,84 AP	4,58 AP	4,32 AP	8,84 AT	4,58 AT	4,32 AT
8,84 AP		0,000157	0,000157	0,000157	0,000157	0,000157
4,58 AP	0,000157		0,000157	0,000157	0,000157	0,000157
4,32 AP	0,000157	0,000157		0,000157	0,000157	0,000157
8,84 AT	0,000157	0,000157	0,000157		0,000157	0,000157
4,58 AT	0,000157	0,000157	0,000157	0,000157		0,000157

Tabela 43 - Valores de p obtidos a partir do teste ANOVA para os diferentes tratamentos térmicos aplicados ao preparado com *Chlorella vulgaris*

Parâmetro	Valor p - 1	Valor p - 2
L*	$1,43 \times 10^{-8}$	$1,05 \times 10^{-12}$
a*	$1,74 \times 10^{-13}$	$1,03 \times 10^{-19}$
b*	$2,86 \times 10^{-9}$	$2,25 \times 10^{-7}$
C	$6,10 \times 10^{-8}$	$6,07 \times 10^{-7}$
h°	$1,09 \times 10^{-15}$	$1,16 \times 10^{-18}$

Tabela 44 – Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro L* do preparado com *Chlorella vulgaris*

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2
A_1		0,873920	0,999877	0,998020	0,000127	0,000127	0,999034	0,999112	0,992700	0,000169	0,000127	0,006131
B_1	0,873920		0,454553	0,999855	0,000127	0,000204	0,352148	0,999601	0,999987	0,007294	0,000127	0,296938
C_1	0,999877	0,454553		0,878913	0,000127	0,000127	1,000000	0,909206	0,805254	0,000130	0,000127	0,000898
D_1	0,998020	0,999855	0,878913		0,000127	0,000133	0,796704	1,000000	1,000000	0,001034	0,000127	0,069321
E_1	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127		0,000334	0,000127	0,000127	0,000127	0,000128	0,715467	0,000127
F_1	0,000127	0,000204	0,000127	0,000133	0,000334		0,000127	0,000132	0,000138	0,936431	0,054798	0,127837
A_2	0,999034	0,352148	1,000000	0,796704	0,000127	0,000127		0,837687	0,705576	0,000129	0,000127	0,000574
B_2	0,999112	0,999601	0,909206	1,000000	0,000127	0,000132	0,837687		1,000000	0,000836	0,000127	0,057489
C_2	0,992700	0,999987	0,805254	1,000000	0,000127	0,000138	0,705576	1,000000		0,001561	0,000127	0,098641
D_2	0,000169	0,007294	0,000130	0,001034	0,000128	0,936431	0,000129	0,000836	0,001561		0,001078	0,899214
E_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,715467	0,054798	0,000127	0,000127	0,000127	0,001078		0,000131
F_2	0,006131	0,296938	0,000898	0,069321	0,000127	0,127837	0,000574	0,057489	0,098641	0,899214	0,000131	

Tabela 45 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro a* do preparado com *Chlorella vulgaris*

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2
A_1		0,848296	0,976288	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
B_1	0,848296		0,999999	0,000127	0,000127	0,000127	0,000141	0,000132	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
C_1	0,976288	0,999999		0,000127	0,000127	0,000127	0,000130	0,000128	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
D_1	0,000127	0,000127	0,000127		0,853746	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
E_1	0,000127	0,000127	0,000127	0,853746		0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
F_1	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127		0,000127	0,000127	0,972940	0,000139	0,258278	0,000127
A_2	0,000127	0,000141	0,000130	0,000127	0,000127	0,000127		1,000000	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
B_2	0,000127	0,000132	0,000128	0,000127	0,000127	0,000127	1,000000		0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
C_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,972940	0,000127	0,000127		0,001022	0,953456	0,000133
D_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000139	0,000127	0,000127	0,001022		0,044156	0,929213
E_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,258278	0,000127	0,000127	0,953456	0,044156		0,000797
F_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000133	0,929213	0,000797	

Tabela 46 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro b* do preparado com *Chlorella vulgaris*

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2
A_1		0,403452	0,999999	0,858766	0,000127	0,000128	0,999927	0,989193	0,999962	0,999667	0,000136	0,643568
B_1	0,403452		0,689055	0,009396	0,000127	0,000127	0,817766	0,975401	0,130058	0,871198	0,000127	1,000000
C_1	0,999999	0,689055		0,600227	0,000127	0,000127	1,000000	0,999857	0,994385	1,000000	0,000129	0,886757
D_1	0,858766	0,009396	0,600227		0,000127	0,000426	0,455793	0,201561	0,994176	0,386666	0,002398	0,025079
E_1	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127		0,026958	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,004638	0,000127
F_1	0,000128	0,000127	0,000127	0,000426	0,026958		0,000127	0,000127	0,000135	0,000127	0,999932	0,000127
A_2	0,999927	0,817766	1,000000	0,455793	0,000127	0,000127		0,999997	0,975401	1,000000	0,000128	0,954533
B_2	0,989193	0,975401	0,999857	0,201561	0,000127	0,000127	0,999997		0,817766	1,000000	0,000127	0,998510
C_2	0,999962	0,130058	0,994385	0,994176	0,000127	0,000135	0,975401	0,817766		0,955551	0,000205	0,268542
D_2	0,999667	0,871198	1,000000	0,386666	0,000127	0,000127	1,000000	1,000000	0,955551		0,000127	0,974733
E_2	0,000136	0,000127	0,000129	0,002398	0,004638	0,999932	0,000128	0,000127	0,000205	0,000127		0,000127
F_2	0,643568	1,000000	0,886757	0,025079	0,000127	0,000127	0,954533	0,998510	0,268542	0,974733	0,000127	

Tabela 47 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro C do preparado com *Chlorella vulgaris*

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2
A_1		0,429328	0,999964	1,000000	0,000127	0,000588	0,821150	0,514719	0,997681	0,789259	0,002289	0,216076
B_1	0,429328		0,816405	0,496700	0,000127	0,000127	0,999958	1,000000	0,946946	0,999985	0,000127	0,999999
C_1	0,999964	0,816405		0,999995	0,000127	0,000188	0,989472	0,878891	1,000000	0,984360	0,000449	0,563338
D_1	1,000000	0,496700	0,999995		0,000127	0,000454	0,871111	0,584732	0,999196	0,843937	0,001709	0,262564
E_1	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127		0,035494	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,009429	0,000127
F_1	0,000588	0,000127	0,000188	0,000454	0,035494		0,000128	0,000127	0,000146	0,000128	0,999995	0,000127
A_2	0,821150	0,999958	0,989472	0,871111	0,000127	0,000128		0,999996	0,999519	1,000000	0,000133	0,995400
B_2	0,514719	1,000000	0,878891	0,584732	0,000127	0,000127	0,999996		0,972983	0,999999	0,000128	0,999990
C_2	0,997681	0,946946	1,000000	0,999196	0,000127	0,000146	0,999519	0,972983		0,999070	0,000233	0,778971
D_2	0,789259	0,999985	0,984360	0,843937	0,000127	0,000128	1,000000	0,999999	0,999070		0,000132	0,997248
E_2	0,002289	0,000127	0,000449	0,001709	0,009429	0,999995	0,000133	0,000128	0,000233	0,000132		0,000127
F_2	0,216076	0,999999	0,563338	0,262564	0,000127	0,000127	0,995400	0,999990	0,778971	0,997248	0,000127	

Tabela 48 - Valores de p obtidos através do teste Tukey-HSD para parâmetro h° do preparado com *Chlorella vulgaris*

	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2	F_2
A_1		0,719236	0,999724	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
B_1	0,719236		0,258536	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
C_1	0,999724	0,258536		0,000127	0,000127	0,000127	0,000128	0,000129	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
D_1	0,000127	0,000127	0,000127		1,000000	0,000129	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
E_1	0,000127	0,000127	0,000127	1,000000		0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
F_1	0,000127	0,000127	0,000127	0,000129	0,000127		0,000127	0,000127	0,095655	0,000127	0,418392	0,000127
A_2	0,000127	0,000127	0,000128	0,000127	0,000127	0,000127		1,000000	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
B_2	0,000127	0,000127	0,000129	0,000127	0,000127	0,000127	1,000000		0,000127	0,000127	0,000127	0,000127
C_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,095655	0,000127	0,000127		0,000129	0,999622	0,000127
D_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000129		0,000127	0,161589
E_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,418392	0,000127	0,000127	0,999622	0,000127		0,000127
F_2	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,000127	0,161589	0,000127	

APÊNDICE VI – APLICAÇÃO DA MICROALGA EM MATRIZES ALIMENTARES – FRUSHAPES DE BANANA COM *CHLORELLA VULGARIS*

Tabela 49 – Médias parâmetros de cor dos *frushapes* na forma seca ao longo de 42 dias de amostragem

pH	L*	a*	b*	C	h°
Dia 0	28,38	4,01	4,95	6,38	50,95
Dia 7	27,87	4,56	5,66	7,27	51,15
Dia 14	33,65	1,90	5,97	6,27	72,29
Dia 21	26,06	5,18	5,19	7,33	45,01
Dia 28	29,56	3,95	7,00	8,04	60,55
Dia 35	26,85	5,03	6,75	8,44	53,56
Dia 42	25,04	5,91	5,89	8,35	44,86

Tabela 50 - Médias parâmetros de cor do preparado onde se aplicaram os *frushapes* ao longo de 42 dias de amostragem

pH	L*	a*	b*	C	h°
Dia 0	54,45	-1,42	25,05	25,09	93,25
Dia 7	57,34	-1,30	23,96	22,75	93,28
Dia 14	58,63	-1,20	23,28	23,31	92,95
Dia 21	59,16	-2,38	25,12	25,22	95,21
Dia 28	57,54	-2,21	25,03	25,13	94,98
Dia 35	56,78	-1,92	25,14	25,22	94,36
Dia 42	56,86	-1,59	23,59	23,63	93,85

Tabela 51 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* na sua forma seca

Parâmetro	Valor p
L*	$4,01 \times 10^{-10}$
a*	$2,77 \times 10^{-11}$
b*	$3,70 \times 10^{-2}$
C	$3,73 \times 10^{-17}$
h°	$4,41 \times 10^{-12}$

Tabela 52 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor do preparado com *frushapes*

Parâmetro	Valor p
L*	$9,43 \times 10^{-16}$
a*	$1,17 \times 10^{-30}$
b*	$8,73 \times 10^{-9}$
C	$3,17 \times 10^{-11}$
h°	$2,09 \times 10^{-18}$

Tabela 53 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro L* dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* aplicados em preparado

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,756918	0,000155	0,000166	0,032341	0,003484	0,000155
Dia 7	0,756918		0,000155	0,000622	0,001297	0,083650	0,000155
Dia 14	0,000155	0,000155		0,000155	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 21	0,000166	0,000622	0,000155		0,000155	0,282509	0,082449
Dia 28	0,032341	0,001297	0,000155	0,000155		0,000155	0,000155
Dia 35	0,003484	0,083650	0,000155	0,282509	0,000155		0,000614
Dia 42	0,000155	0,000155	0,000155	0,082449	0,000155	0,000614	

Tabela 54 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro b* dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* na sua forma seca

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,698009	0,185139	1,000000	1,000000	0,999999	0,380820
Dia 7	0,698009		0,949603	0,634789	0,710773	0,614845	0,997920
Dia 14	0,185139	0,949603		0,153592	0,192269	0,144747	0,999177
Dia 21	1,000000	0,634789	0,153592		1,000000	1,000000	0,327353
Dia 28	1,000000	0,710773	0,192269	1,000000		0,999998	0,392457
Dia 35	0,999999	0,614845	0,144747	1,000000	0,999998		0,311745
Dia 42	0,380820	0,997920	0,999177	0,327353	0,392457	0,311745	

Tabela 55 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro C dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* na sua forma seca

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,000155	0,000155	0,874298	0,999775	0,900409	0,000155
Dia 7	0,000155		0,000911	0,000155	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 14	0,000155	0,000911		0,000155	0,000155	0,000155	0,097765
Dia 21	0,874298	0,000155	0,000155		0,973924	1,000000	0,000155
Dia 28	0,999775	0,000155	0,000155	0,973924		0,982678	0,000155
Dia 35	0,900409	0,000155	0,000155	1,000000	0,982678		0,000155
Dia 42	0,000155	0,000155	0,097765	0,000155	0,000155	0,000155	

Tabela 56 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro h° dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* na sua forma seca

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,999990	0,532367	0,000155	0,000155	0,000166	0,019935
Dia 7	0,999990		0,408021	0,000155	0,000155	0,000174	0,031649
Dia 14	0,532367	0,408021		0,000155	0,000155	0,000155	0,000421
Dia 21	0,000155	0,000155	0,000155		0,784818	0,000746	0,000155
Dia 28	0,000155	0,000155	0,000155	0,784818		0,015776	0,000163
Dia 35	0,000166	0,000174	0,000155	0,000746	0,015776		0,067850
Dia 42	0,019935	0,031649	0,000421	0,000155	0,000163	0,067850	

Tabela 57 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro a* dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* na sua forma seca

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,847674	0,227041	0,000155	0,000155	0,000601	0,592314
Dia 7	0,847674		0,901879	0,000155	0,000155	0,000172	0,076282
Dia 14	0,227041	0,901879		0,000155	0,000155	0,000155	0,006319
Dia 21	0,000155	0,000155	0,000155		0,494406	0,001104	0,000155
Dia 28	0,000155	0,000155	0,000155	0,494406		0,068486	0,000169
Dia 35	0,000601	0,000172	0,000155	0,001104	0,068486		0,024806
Dia 42	0,592314	0,076282	0,006319	0,000155	0,000169	0,024806	

Tabela 58 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro L* dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* na sua forma seca

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,000155	0,000155	0,000155	0,000155	0,000172	0,000164
Dia 7	0,000155		0,020641	0,000826	0,997381	0,698847	0,818621
Dia 14	0,000155	0,020641		0,747736	0,067250	0,000706	0,001078
Dia 21	0,000155	0,000826	0,747736		0,002645	0,000168	0,000178
Dia 28	0,000155	0,997381	0,067250	0,002645		0,369542	0,492852
Dia 35	0,000172	0,698847	0,000706	0,000168	0,369542		0,999988
Dia 42	0,000164	0,818621	0,001078	0,000178	0,492852	0,999988	

Tabela 59 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro h° dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* aplicados em preparado

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,999985	0,000155	0,000163	0,000155	0,080810	0,000160
Dia 7	0,999985		0,000155	0,000159	0,000155	0,125547	0,000158
Dia 14	0,000155	0,000155		0,000155	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 21	0,000163	0,000159	0,000155		0,000155	0,000155	0,999997
Dia 28	0,000155	0,000155	0,000155	0,000155		0,000155	0,000155
Dia 35	0,080810	0,125547	0,000155	0,000155	0,000155		0,000155
Dia 42	0,000160	0,000158	0,000155	0,999997	0,000155	0,000155	

Tabela 60 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro a* dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* aplicados em preparado

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,000155	0,000155	0,000155	0,534139	0,000155	0,000155
Dia 7	0,000155		0,000155	0,000155	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 14	0,000155	0,000155		0,000155	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 21	0,000155	0,000155	0,000155		0,000155	0,001247	0,000155
Dia 28	0,534139	0,000155	0,000155	0,000155		0,000155	0,000155
Dia 35	0,000155	0,000155	0,000155	0,001247	0,000155		0,000155
Dia 42	0,000155	0,000155	0,000155	0,000155	0,000155	0,000155	

Tabela 61 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro b* dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* aplicados em preparado

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,031552	0,001196	0,900954	0,000155	0,000155	0,002722
Dia 7	0,031552		0,742162	0,285190	0,000180	0,000683	0,917262
Dia 14	0,001196	0,742162		0,015128	0,001196	0,016822	0,999684
Dia 21	0,900954	0,285190	0,015128		0,000155	0,000156	0,034996
Dia 28	0,000155	0,000180	0,001196	0,000155		0,882887	0,000577
Dia 35	0,000155	0,000683	0,016822	0,000156	0,882887		0,007139
Dia 42	0,002722	0,917262	0,999684	0,034996	0,000577	0,007139	

Tabela 62 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro C dos *frushapes* de banana com *Chlorella vulgaris* aplicados em preparado

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Dia 0		0,001186	0,996756	0,000660	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 7	0,001186		0,000406	0,999921	0,005633	0,000181	0,000242
Dia 14	0,996756	0,000406		0,000274	0,000155	0,000155	0,000155
Dia 21	0,000660	0,999921	0,000274		0,011116	0,000212	0,000340
Dia 28	0,000155	0,005633	0,000155	0,011116		0,335064	0,603897
Dia 35	0,000155	0,000181	0,000155	0,000212	0,335064		0,999030
Dia 42	0,000155	0,000242	0,000155	0,000340	0,603897	0,999030	

APÊNDICE VII – APLICAÇÃO DA MICROALGA EM MATRIZES ALIMENTARES – POWER BUBBLE E “PREPARADO MEDITERRÂNICÓ”

Tabela 63 - Médias parâmetros de cor do “Preparado mediterrânico” ao longo de 21 dias de amostragem

pH	L*	a*	b*	C	h°
Dia 0	23,63	13,69	12,17	18,33	41,85
Dia 7	22,99	5,47	9,54	10,99	60,17
Dia 14	23,31	9,58	10,85	14,66	51,01
Dia 21	23,31	9,58	10,85	14,66	51,01

Tabela 64 - Médias parâmetros de cor das *Power Bubble* ao longo de 21 dias de amostragem

pH	L*	a*	b*	C	h°
Dia 0	23,44	-2,48	6,30	6,79	111,55
Dia 7	22,18	-1,34	8,11	8,22	99,25
Dia 14	25,64	-2,03	10,20	10,41	101,24
Dia 21	23,00	-0,84	8,99	9,03	95,35

Tabela 65 - Médias parâmetros de cor da calda de conservação das *Power Bubble* ao longo de 21 dias de amostragem

pH	L*	a*	b*	C	h°
Dia 0	27,91	3,08	-1,48	3,41	334,29
Dia 7	40,73	1,11	3,69	3,85	73,16
Dia 14	26,75	3,76	1,81	4,17	25,71
Dia 21	34,72	2,47	3,88	4,60	57,52

Tabela 66 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

Parâmetro	Valor p
L*	$3,89 \times 10^{-2}$
a*	$6,62 \times 10^{-6}$
b*	$1,27 \times 10^{-5}$
C	$1,49 \times 10^{-5}$
h°	$4,72 \times 10^{-8}$

Tabela 67 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro L* do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Dia 0		0,024051	0,367392	0,367392
Dia 7	0,024051		0,367392	0,367392
Dia 14	0,367392	0,367392		1,000000
Dia 21	0,367392	0,367392	1,000000	

Tabela 68 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro a* do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Dia 0		0,000200	0,002287	0,002287
Dia 7	0,000200		0,002287	0,002287
Dia 14	0,002287	0,002287		1,000000
Dia 21	0,002287	0,002287	1,000000	

Tabela 69 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro b* do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Dia 0		0,000201	0,003615	0,003615
Dia 7	0,000201		0,003615	0,003615
Dia 14	0,003615	0,003615		1,000000
Dia 21	0,003615	0,003615	1,000000	

Tabela 70 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro C do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Dia 0		0,000201	0,004044	0,004044
Dia 7	0,000201		0,004044	0,004044
Dia 14	0,004044	0,004044		1,000000
Dia 21	0,004044	0,004044	1,000000	

Tabela 71 - Valores de p resultantes do teste Tukey para parâmetro h° do “Preparado mediterrânico” com *Chlorella vulgaris*

	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Dia 0		0,000199	0,000229	0,000229
Dia 7	0,000199		0,000229	0,000229
Dia 14	0,000229	0,000229		1,000000
Dia 21	0,000229	0,000229	1,000000	

Tabela 72 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor das *Power Bubble* com *Chlorella vulgaris*

Parâmetro	Valor p
L*	$6,15 \times 10^{-4}$
a*	$1,63 \times 10^{-11}$
b*	$5,03 \times 10^{-7}$
C	$9,38 \times 10^{-7}$
h°	$1,10 \times 10^{-11}$


Tabela 73 - Valores de p resultantes do teste Anova para as variações de cor da calda de conservação das *Power Bubble* com *Chlorella vulgaris*

Parâmetro	Valor p
L*	$1,63 \times 10^{-21}$
a*	$3,60 \times 10^{-16}$
b*	$2,34 \times 10^{-14}$
C	$1,91 \times 10^{-6}$
h°	$2,85 \times 10^{-27}$


APÊNDICE VIII – APLICAÇÃO DA MICROALGA EM MATRIZES ALIMENTARES – LISTA DE MATÉRIAS-PRIMAS E RESPECTIVOS FORNECEDORES

Matéria-Prima	Produtor	Origem
Concentrado de sumo de ananás	SVZ INternational B.V	Holanda
Concentrado de sumo de framboesa	IPRONA	Itália
Concentrado sumo laranja	Citrosuco S.A Agroindustria	Brasil
Concentrado de sumo de maçã	BioFun-Produtos biológicos do Fundão	Portugal
Concentrado de puré de manga	Netra Agro BV	Holanda
Polme banana acidificada	Tropilight	
Sumo de maracujá assético	Organic Passionfruit juice NFC	
Puré de maçã golden	Iberfruta	Espanha
Extracto de guaraná	Euroingredients	Portugal
Aroma banana concentrado I	Expressions Aromatiques	França
Concentrado sumo banana	Fruitraco	Holanda
Amido Modificado de Milho E1442	Ingredion	EUA
Carragenato Gelcarin DG5264 (E407)	FMC BioPolymer	EUA
Concentrado de sumo de limão assético	Miguel Parra e hijos, s.a	Espanha
Aroma de banana concentrado II	Expressions Aromatiques	Espanha
Alho tostado granulado	TRADES, S.A.	Canadá
Sal refinado	Salins	França
Aneto	Worlée	Alemanha
Glutamato monossódico E621	Quimidroga	Espanha
Manteiga tradicional com sal	Mimosa	Portugal
Concentrado puré de tomate	Sutol	Portugal
Salsa desidratada	Elite	
Pectina LMA (E440II) Halal	CPKelco	EUA
Banana em pó (0-2 mm)	Paradies Frucht GMBH	Alemanha
Sêmola de Trigo Duro	Harinera Vilafranquina, S.A.	Espanha
Cebola tostada em pó	TRADES, S.A.	Canadá
Courgette fresca	Madiguima, Comércio de frutas LDA.	Portugal
Pimentos 3 cores	Daregal	França
Azeitona rodelas	Maçarico, fábrica de conservas alimentares	Portugal
Beringela fresca	Madiguima, Comércio de frutas LDA.	Portugal

APÊNDICE IX – COMUNICAÇÕES REALIZADAS EM CONGRESSOS (POSTERS)



Study of the effect of pH on colour of flavoured solutions of *Spirulina spp.* and *Chlorella vulgaris*




A. Catarina Correia^{1,2}, Pilar Morais², M. Helena Gomes², Carla Barbosa¹, Manuela Vaz Velho¹


¹ Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Av. Atlântico, 4900-348 Viana do Castelo, Portugal;
² FRUTECH – Centro de Inovação e Tecnologia Agro-Alimentar, R. do Outeiro, 589, 4475-150 Gemunde, Maia, Portugal
 mvazvelho@estg.ipvc.pt

Introduction

Microalgae have been identified as an alternative and innovative source of nutrients considered important to human diet, in particular as a source of natural antioxidants not only carotenoids but also polyphenols. The microalgae *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) have been also widely studied for human consumption purposes not only because of its antioxidant properties but also as a protein-rich “health” food. *Spirulina spp.*, which has been reclassified as a Cyanobacteria and renamed *Arthrospira spp.*, has also been widely studied as a food ingredient or supplement. Preliminary works shown that the stability of the characteristic green colour of *Chlorella vulgaris* is more susceptible to low pH and to heat treatments compared to the *Spirulina spp.* blue/green colour. The general purpose of this study is to use a mix of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina spp.* as ingredients for the future development of a beverage product, with high protein and antioxidants contents, preserving the natural green colour considered to be an added value factor to the product.



Spirulina spp.
100% spray dried biomass (lower, China)



Chlorella vulgaris.
100% spray dried biomass (<http://www.klima.com/eng/microalgae>)

Methods

In order to evaluate the influence of pH on the stability of the colour of these microalgae, solutions of concentrated lemon juice (54° Brix) with 0.10% of *Spirulina spp.* and 0.20% of *Chlorella vulgaris*, up to 100ml of water, were prepared at three pH values: 8.84 (control without lemon juice), 4.58 and 4.32. Colour of the solutions was measured immediately after the preparation and after a thermal treatment (T=80°C, 5 min). The following parameters were registered: lightness (L*), colour coordinates a* and b*, saturation (C*) and hue (h°). A one way ANOVA was applied (Statistica 7). Differences were considered significant if p<0.05.

Results and Discussion

pH value was found to have a significant effect in all parameters, independently of the step (before or after pasteurisation). In the spite of the pH value, the pasteurisation step significantly influenced the a* and h° parameters of all solutions. Despite of the significant effect of pasteurisation on the solution at pH 8.84, only this one kept the blue/green colour after heat treatment. In conclusion, although there was a slightly improve on colour stability, compared to previous works with *Chlorella vulgaris* alone, other mixes and concentrations of the two species and different pH must be tested.

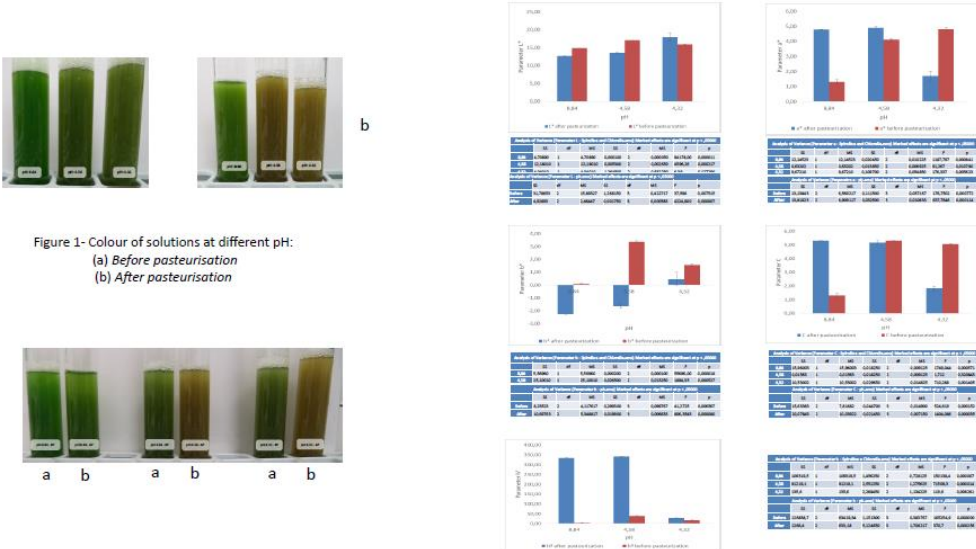







Figure 1- Colour of solutions at different pH:
 (a) Before pasteurisation
 (b) After pasteurisation

Acknowledgements: Work supported by project FRUTECH, 2010-2014. PRODER, Nº 020213012244

8th International Conference on Water in Food
IFW2014

Figura 42 - Poster apresentado em comunicação no congresso :8 th Eurofoodwater conference. Timisoara, Roménia, 25 a 27 Maio de 2014




STUDY OF THE EFFECT OF pH ON COLOR OF FLAVORED SOLUTIONS OF *Spirulina spp.*

A. Catarina Correia^{1,2}, Pilar Morais², M. Helena Gomes², Carla Barbosa¹, Rita Pinheiro¹, Manuela Vaz Velho¹

¹UIDICTA; Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Av. Atlântico, 4900-348 Viana do Castelo, Portugal;

²FRUTECH – Centro de Inovação e Tecnologia Agro-Alimentar, R. do Outeiro, 589, 4475-150 Gemunde, Maia, Portugal
mvazvelho@estg.ipv.pt



Introduction

Microalgae are a renewable source of enormous potential for obtaining a wide variety of products such as carotenoids, pigments, vitamins, proteins, fatty acids, and other active compounds. Although not well known by the general population, Microalgae are used for a long time for production of compounds for various types of industries (pharmaceuticals, cosmetics) and also for human food (Gouveia et al., 2007). The use of microalgae in the diet of humans, is one of the first records of 2000 years ago, in which the Chinese use *Nostoc* species (currently classified as cyanobacteria) in periods of high food shortages (Priyadarshani and Rath, 2012; Spolatore et al., 2006). Also the Aztec people used various microalgae (eg *Spirulina*, now classified as cyanobacteria) in their daily diet (Bewicke and Potter, 2009). In addition to its nutritional value, these small organisms have the ability to perform photosynthesis process, converting solar energy into chemical energy. This conversion mechanism is largely similar to what occurs in terrestrial plants, where photosynthesis takes place in specific complexes called chloroplasts. (Harun et al., 2010; Priyadarshani and Rath, 2012). Chlorophyll is the pigment responsible for the characteristic green color of many fruits and vegetables, as well as of microalgae. This pigment is extremely sensitive to many factors, reaching suffer irreversible changes when exposed to unfavorable conditions of pH and temperature. Generally, the major cause of loss of the characteristic green color is due to the conversion of chlorophyll pigment in pheophytin when the medium is too acid or when the products are subjected to too high processing temperatures (Koca et al. 2007). In this reaction the green color is converted to an olive green color which for most consumers is perceived as negative feature.

The cyanobacteria *Arthrospira*, commonly known as *Spirulina* (previously classified as a microalgae) is used for human consumption due its high protein content (60-70%). It is also rich in iron, unsaturated fatty acids, mainly γ -linolenic acid (Posten and Walter, 2012). In addition to those nutritional properties is also one of the few cyanobacteria that was recognized and received the status of GRAS (Generally Recognized as Safe) by the FDA, thus safe for human consumption. Because it is a FDA recognized ingredient, make possible its incorporation into the development of new products. The main objective of this work was to study the effect of pH on color of *Spirulina spp.* solutions aiming its further incorporation in food matrices alone or together with other microalgae.

Methods

To evaluate the behavior of *Spirulina spp.* at different pH values, three solutions of water and concentrated lemon juice were prepared. Lemon juice concentrate (54 Brix) was chosen in order to simulate the conditions of a fruit juice composition, the new product intended to be developed. A solution of 100% water, having pH of 9.08, was set as control. 0.12 and 0.44 g of lemon juice were placed in plastic tubes and water was added up to a volume of 100 ml and mixed until complete dissolution. The pH of each solution was then measured. To these solutions 0.10 g (0.10%) of *Spirulina* powder (100% spray dried biomass, Iswari, China) were added and stirred until complete dissolution (Table 1). The color of these three solutions was measured immediately after preparation and after a further thermal treatment (T=80°C, 5 min). The pasteurized solutions were kept at room temperature (18 ± 2 °C) to cool down before color measurement. For each step, before and after pasteurization, two consecutive color measurements were made and the values of lightness (L*), coordinates a* and b*, saturation (C) and hue (h°) were recorded (colorimeter Konica Minolta CR 400) (Table 2). For the statistical analysis the software STATISTICA version 7 (StatSoft, Inc, USA) was used.

Results and discussion

Apart from preserving *Spirulina* nutritional value, preserving its natural blue/green colour, when subjected to different pH and heat processing, was considered to be an added value factor to the new product development. If this experiment was successful on preserving colour, new products with *Spirulina spp.* alone or *Spirulina spp.* with other microalgae, such as *Chlorella vulgaris*, could be developed. There are already some commercial applications where *Spirulina spp.* and *Chlorella vulgaris* are used in combination.

In this experiment difficulties of dissolution of *Spirulina* in water were found and in a short time after mixing/stirring deposition of *Spirulina* particles occurred (Fig. 2). Even so, as it was considered that the application of *Spirulina spp.* would be advantageous for various food applications, it was important to evaluate its performance at different pH values. Results showed that pH have a significant effect in all color parameters of all solutions before pasteurization and there were significant differences between samples (p<0.005) (Fig. 3). The acid solutions (pH 4.64 and 3.44) acquired a brownish color. Also, the heat treatment, significantly influenced the color parameters of all solutions.




Fig. 1 *Spirulina spp.*
100% spray dried biomass
(Iswari, China)

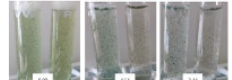


Fig. 2 - *Spirulina spp.* solutions at different pH values, before and after pasteurization, respectively in left and right containers

	Lemon concentrate (g)	<i>Spirulina</i> powder (g)	water (ml)	pH
Control	—	0.10	100	9.08
Solution 1	0.12	0.10	99.88	4.64
Solution 2	0.44	0.10	99.56	3.44

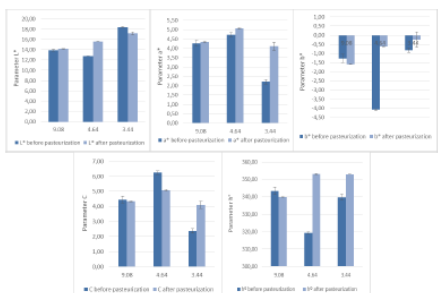




Fig. 3 Variation of color (L*, a*, b*, C e h° parameters) of *Spirulina spp.* solutions at different pH, before and after pasteurization

For parameter b*, the highest value recorded was in samples at pH = 3.44 after pasteurization, this solution being the closest to the yellow color. Again, we could also verify, that pH and heat treatment significantly affected the b* parameter of solutions, the control solutions (pH=9.08) being less influenced by the heat treatment.

Regarding the behavior of the parameter saturation C*, control samples were not significantly affected by pasteurization step and this parameter value was significantly affected by pH before and after pasteurization. Hue angle (h°) of control samples was not affected by pasteurization whereas. However, both C* and h° values of the three samples do not follow a pattern with respect to pH value, and this might be due to cyanobacteria particle's aggregation which created difficulties in measuring these parameters. However is again noticeable that the control solutions are less affected by pasteurization.


Conclusions

The effect of pasteurization did not significantly affected the control solutions (pH 9.08) with respect to the L, a*, h°, C and b* parameters and the blue/green color was kept at this pH value in all samples before pasteurization. However aggregation of particles occurred which pose difficulties in stabilizing the solutions. The fact that samples at acid pH were affected by the heat treatment, make clear that for preserving the blue/green color solutions having a pH near neutrality can be tested. Therefore, for the further development of pasteurized blue/green colored beads with a liquid center, other mixes and/or other concentrations of *Spirulina spp.* alone, or with other components, should be also tested.






Acknowledgements: Project FRUTECH, 2010-2014. PRODER, Nº 020213012244

Figura 43 - Poster apresentado em comunicação no congresso :FoodInnova, Concordia Argentina, 20 a 23 de Outubro de 2014



Estudo do efeito do pH e da pasteurização na cor de soluções tamponadas com *Chlorella vulgaris*



A. Catarina Correia^{1,2}, Pilar Morais², M. Helena Gomes², Carla Barbosa¹, Manuela Vaz Velho¹

¹ Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Av. Atlântico, 4900-348 Viana do Castelo, Portugal;
² FRUTECH – Centro de Inovação e Tecnologia Agro-Alimentar, R. do Outeiro, 589, 4475-150 Gemunde, Maia, Portugal
 mvazvelho@estg.ipv.pt

Introdução

As microalgas estão identificadas como uma fonte alternativa de nutrientes importantes para a alimentação humana, em particular como fonte de antioxidantes naturais, não só carotenoides mas também polifenóis. A microalga *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) foi também estudada para aplicações na alimentação humana. Esta microalga é conhecida pela sua composição rica em vitaminas, minerais, proteínas e aminoácidos essenciais. Uma das características mais marcantes e interessantes do ponto de vista nutricional é o alto teor em proteína apresentado por esta (aproximadamente 60%) podendo comparar-se, no que diz respeito a esta característica a um ovo (Lee and Rosebaum, 1987; Priyadarshani and Rath, 2012). O objetivo geral deste trabalho é estudar a influência do pH e da temperatura na cor de soluções com *Chlorella vulgaris*, de modo a antecipar o comportamento da cor quando incorporada em matrizes alimentares posteriormente desenvolvidas.

Métodos

Com o objetivo de avaliar o comportamento da microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes valores de pH foram preparadas diversas soluções tampão (com 0,18 g (0,18%) de *Chlorella vulgaris* (Fig. 1) utilizando hidrogenofosfato de sódio (0,2 M; grau de pureza: 98,5-100%; Sigma Aldrich, Espanha) e ácido cítrico (0,1 M, grau de pureza:100%; Yixing-Union Biochemical CO., LTD (China)). Os valores de pH das diferentes soluções são respetivamente de 2,77; 3,23; 3,70; 4,19; 4,31; 4,55; 5,46. A cor das soluções foi medida imediatamente após a preparação, após 24 horas e após tratamento térmico (T = 95 ° C, 10 min). Por cada tratamento, foram registados os valores de luminosidade (L*), as coordenadas a* e b*, de saturação (C) e do ângulo hue (h°) (colorímetro Konica Minolta CR 400). Para a análise estatística foi utilizado o software STATISTICA versão 7 (StatSoft, Inc, EUA). As diferenças consideram-se significativas para p<0,05.

Resultados e Discussão

A cor característica da microalga *Chlorella vulgaris* sofreu alterações nas diferentes gamas de pH (Fig. 2). As diferenças são mais perceptíveis nas soluções com pH mais baixos e após aplicação de tratamento térmico. A conversão da cor verde característica, que se verifica deve-se não só à aplicação do tratamento térmico mas também ao pH das soluções. As amostras cujos valores de pH são mais próximos da neutralidade mantêm a sua cor verde, mas quando se baixa o pH para valores mais ácidos a mudança de cor é notória. Esta mudança de cor deve-se à conversão da clorofila em feofitina pela ação do pH (a taxa de degradação da clorofila decresce com o aumento do pH) (Andres-Bello et al., 2013).

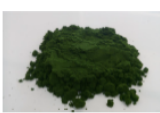


Fig. 1. *Chlorella vulgaris*.
100% biomassa seca por pulverização
(<http://www.stms.com/img/microalgae>)

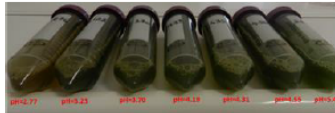


Fig 2. Soluções após aplicação tratamento térmico

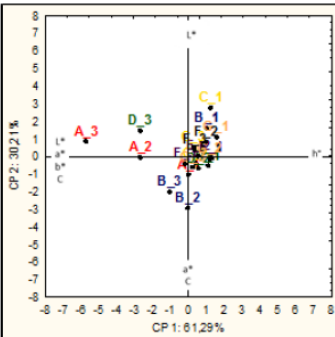


Fig 3. Análise de componentes principais
 A-pH=2,77; B- pH=3,23; C-pH=3,70; D- pH=4,19; E- pH=4,31; F-pH=4,55; G- pH=5,46.
 1-Após preparação; 2-Após 24 horas;3-Após 24 horas e posterior pasteurização

Conclusões

A aplicação de *Chlorella vulgaris* em matrizes alimentares apenas será positiva (em termos visuais), se incorporada em produtos cujo pH se aproxima da neutralidade e cujos tratamentos térmicos que o originam não se mostram demasiado agressivos.

Referências

Andres-Bello, A., Barreto-Palacios, V., Garcia-Segovia, P., Mir-Bel, J., and Martinez-Monzo, J. 2013. Effect of pH on Color and Texture of Food Products: Food Engineering Reviews, 5:158-170.
 Lee, W.H., Rosenbaum, M. 1987. *Chlorella* - The sun-powered super nutrient and its beneficial properties. Keats Pub. Inc., Connecticut, USA. ISBN: 0879834641
 Priyadarshani, I., and Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. Journal of Algal Biomass Utilization, 3 (4): 89–100.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelo projeto FRUTECH, 2010-2014. PRODER, Nº 020213012244








Figura 44 - Poster apresentado em comunicação oral/poster no Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura – VII Firma Machala, Equador, 18 a 21 de Novembro

APÊNDICE X – EXEMPLOS DE PRODUTOS DESENVOLVIDOS AO LONGO DO PROJETO

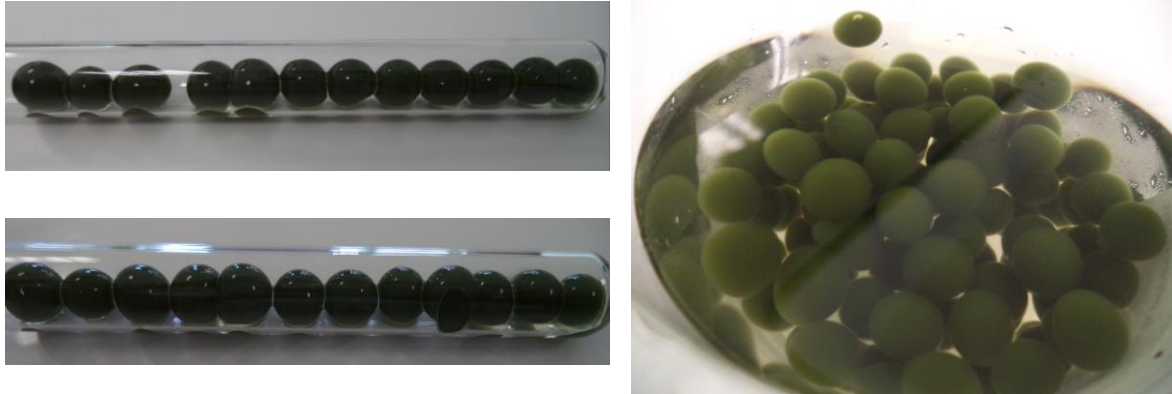


Figura 45 - Power bubble com *Chlorella vulgaris* (produto analisado através do teste de aceitabilidade)



Figura 46 - Preparado mediterrânico com *Chlorella vulgaris* aplicado em queijo “Philadelphia”