



INFLUÊNCIA DA INTEGRAÇÃO DE EXTRATO E COMPLEXO BIOATIVO DE CODIUM TOMENTOSUM EM ALIMENTOS FUNCIONAIS

MICAELA CAMPOS COSTA

Julho de 2022



INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUIMICA

RAMO QUALIDADE

**PODEM AS ALGAS MARINHAS PROTEGER O NOSSO CÉREBRO DE
DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS?
INFLUÊNCIA DA INTEGRAÇÃO DE EXTRATO E COMPLEXO BIOATIVO
DE *CODIUM TOMENTOSUM* EM ALIMENTOS FUNCIONAIS**

Autor

Micaela Costa

Orientadoras externas

Doutora Clara Grosso (Investigadora do GRAQ)

Doutora Cristina Soares (Investigadora do GRAQ)

Orientadora Interna

Professora Doutora Cristina Delerue-Matos (ISEP)

**Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, Ramo de Qualidade**

Agradecimentos

Pela oportunidade da realização deste estudo quero primeiramente agradecer à Doutora Clara Grosso e Doutora Cristina Soares, pela paciência e acompanhamento incansável ao longo dos últimos meses e pela compreensão face às minhas dificuldades como aluna que não provinha da área de química e que estava a operar pela primeira vez no laboratório. Agradeço ainda à Professora Doutora Cristina Delerue-Matos pela oportunidade de ingressar neste projeto, e pelas palavras ao longo das cadeiras de mestrado, uma das profissionais que me acompanhou e inspirou a não desistir.

Não posso deixar também de agradecer aos meus pais pelos inúmeros “é só mais este esforço” e “tu consegues, nós acreditamos em ti” e ao meu irmão pela paciência para me emprestar o quarto e ecrã por inúmeras horas, mesmo quando a vontade era pouca.

Um enorme obrigada ao meu líder profissional que permitiu que durante dois anos agilizasse o meu horário de trabalho para poder frequentar este mestrado e pelos inúmeros cafés naqueles dias difíceis depois de poucas horas de sono.

Não posso deixar de agradecer também a um grande profissional, ao Eng^o António Tavares por me ter despertado o “bichinho” pela área da química dos materiais, e pelas horas de paciência e discussões (sempre construtivas).

Finalmente, não posso deixar de agradecer à Técnica de laboratório, Aurora Silva, pelos inúmeros “tu outra vez?” que me acompanhou em inúmeros ensaios, dias, horas, e que nunca me disse um “não” mesmo quando a paciência e cansaço já nos venciam.

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do projeto PTDC/OCE-ETA/30240/2017 – SilverBrain – Do mar para o cérebro: Extratos verdes neuroprotetores para nanoencapsulamento e produção de alimentos funcionais, financiado pela União Europeia e Fundação para a Ciência e a Tecnologia ((POCI-01-0145-FEDER-030240).

Resumo

Devido ao aumento da esperança média de vida, torna-se cada vez mais importante promover a saúde durante o envelhecimento. Portanto, a busca por novos compostos neuroprotetores é um dos maiores desafios da atualidade. Neste contexto, as macroalgas marinhas são consideradas excelentes fontes de moléculas bioativas estruturalmente diversas com reconhecido potencial farmacêutico e biomédico. Assim, durante este trabalho, estudou-se a integração de uma fração do extrato de *Codium tomentosum* obtido por extração subcrítica com água em fitossomas e posterior integração num alimento funcional, um iogurte.

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas por espectrofotometria UV, calorimetria de varrimento diferencial (DSC) e espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier, que permitiram confirmar a formação do complexo fitóssomico; analisou-se ainda a sua solubilidade em octanol-água e respetivo coeficiente de partição, comprovando se o aumento da lipofilicidade e hidrofiliicidade em comparação à fração de extrato não encapsulada.

Confirmada a formação dos complexos fitóssomico, produziram-se vários iogurtes integrando tanto a fração de *Codium tomentosum* como a fração complexada nos fitossomas, e analisando a sua influência neste alimento. Os parâmetros avaliados consistiram pela análise das suas características físico-químicas controlando se durante 7 dias a evolução do pH, acidez, sinérese, humidade, peróxidos, proteínas, lípidos totais, teor de açúcar, cinzas e a composição em minerais, como o cálcio, sódio e magnésio, permitindo ainda calcular o poder calórico dos alimentos e o teor de sal. Para além dos parâmetros físico-químicos, foi também avaliada a capacidade de inibição das enzimas cerebrais colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), envolvidas na patogénese da doença de Alzheimer, por parte dos iogurtes funcionais. Os iogurtes funcionais apresentaram fraca atividade contra estas enzimas, podendo concluir-se que o seu efeito benéfico só será visível após consumo duradouro, ou seja, por efeito cumulativo no organismo.

Estes alimentos foram ainda analisados sensorialmente por olfato, aspeto visual e paladar, concluindo-se que a adição de percentagens de extrato acima dos 0,01% afetam a tonalidade do mesmo tornando-a amarelada e pouco apelativa depositando-se ainda resíduos de extrato na base do recipiente de preparação do alimento.

Palavras-Chave Alimentos funcionais, Compostos Bioativos, Neuroproteção, Nanoencapsulamento, Tempo de prateleira

Abstract

Due to the increase of the average life expectancy, it becomes increasingly important to promote health during aging. Therefore, the search for new neuroprotective drugs is one of the biggest challenges of today, and, in this context, marine macroalgae are considered excellent sources of structurally diverse bioactive molecules with recognized pharmaceutical and biomedical potential. During this work, the integration of a fraction of *Codium tomentosum* extract obtained by subcritical water extraction into phytosomes and subsequent integration into functional food, an yogurt, was studied.

The nanoparticles produced were characterized by UV spectrophotometry, differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), which allowed confirming the formation of the phytosome complex; and the octanol:water partition ratio proved an increase in lipophilicity and hydrophilicity compared to the non-encapsulated fraction.

Once the formation of phytosome complexes was confirmed, various yogurts were produced integrating *Codium tomentosum* fraction and phytosomes, analyzing their influence on this food, by analyzing their physical-chemical characteristics, controlling for 7 days the evolution of pH, where a lower ratio of the reduction of this parameter was detected in samples containing extract or phytosomes, acidity, syneresis, which showed a tendency to increase as the percentage of extract included in the food increased, moisture, peroxides, where nanoencapsulation controlled its formation, proteins, total lipids, sugar content, ash and mineral composition, such as calcium, sodium and magnesium, also allowing the calculation of the calorific value of food and salt content. Besides physico-chemical parameters, the capacity of the produced yogurts to inhibit cholinesterases – acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) – which are brain enzymes involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, was studied. The functional yogurts displayed weak enzyme inhibition, showing that their beneficial health effect will be probably by cumulative effect after regular consumption.

These foods were also sensorially analyzed by smell, visual aspect and taste, concluding that the addition of percentages of extract above 0.01% affects the tone of the food, making it yellowish and unappealing, and also depositing extract residues in the base of the food preparation container.

Keywords: Functional foods, Bioactive compounds, Neuroprotection, Nanoencapsulation, Shelf life

Índice

1. Introdução.....	1
2. Estado da Arte	3
2.1 Alimentos funcionais.....	3
2.2 Compostos Bioativos.....	7
2.2.1 Probióticos	7
2.2.2. Prebióticos.....	11
2.2.3 Simbióticos	12
2.2.4 Ácidos gordos ómega-3	13
2.2.5 Vitaminas antioxidantes.....	14
2.2.6 Carotenoides	15
2.2.7 Fibras alimentares	15
2.2.8 Compostos Fenólicos	16
2.3 Macroalgas.....	17
2.4 Neuroproteção e nanoencapsulamento	21
2.4.1 Lipossomas	25
2.4.2 Fitossomas.....	26
2.5 Avaliação do tempo de prateleira, análise sensorial e nutricional de alimentos que integram compostos bioativos	28
2.5.1 Tempo de prateleira	28
2.5.2 Análise sensorial	30
2.5.3 Deterioração química	31
2.5.3.1 Oxidação lipídica.....	31
2.5.3.2 Degradação enzimática	32
2.5.3.3 Escurecimento não enzimático.....	32
2.5.3.4 Foto-oxidação.....	33

2.5.3.5 Degradação de proteínas	33
2.5.4 Deterioração Física	34
2.5.5 Fatores de deterioração	35
2.5.5.1 Temperatura	35
2.5.5.2 Atividade da água (aw)	35
2.5.5.3 pH.....	36
2.5.5.4 Oxigénio e Luz	36
2.5.6 Métodos de estudo do tempo de prateleira	37
2.6. Objetivos da dissertação	38
3. Secção Experimental	39
3.1 Materiais e reagentes	39
3.2 Resultados de estudos prévios	39
3.3 Preparação dos Fitossomas	40
3.4 Caracterização de Fitossomas.....	42
3.4.1 Solubilidade e coeficiente de partição octanol-água.....	42
3.4.2 Espectro ultravioleta	42
3.4.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	43
3.4.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	43
3.5 Produção dos alimentos funcionais	44
3.6 Análises físico-químicas dos iogurtes	45
3.6.1 pH.....	45
3.6.2 Acidez	45
3.6.3 Sinérese	45
3.6.4 Índice de Peróxidos.....	46
3.6.5 Humidade, Sólidos Totais, Matéria orgânica e Matéria inorgânica (Cinzas)	46
3.6.6 Minerais Ca, K, Mg e Na	47
3.6.7 Lípidos Totais	47

3.6.8 Proteínas.....	48
3.6.10. Determinação de Açúcares Totais	48
3.6.11. Valor energético.....	49
3.6.12. Ensaio de inibição das enzimas AChE e BuChE.....	49
3.7 – Análise sensorial.....	50
4.1 Caracterização dos fitossomas.....	51
4.1.1 Composição: ApoE3 e DSPE-PEG.....	51
4.1.2 Solubilidade e coeficiente de partição	51
4.1.2 Espectro ultravioleta (Espectro UV).....	52
4.1.2 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	53
4.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	55
4.2 - Caracterização dos alimentos funcionais	56
4.2.1 Inibição da AChE e BuChE	56
4.2.2 pH e Acidez.....	59
4.2.4 Humidade, Sinérese e Matéria Orgânica	60
4.2.5 Índice de Peróxido e Lípidos Totais	61
4.2.6 Matéria inorgânica (Cinzas) e Minerais (Ca, K, mg e Na)	62
4.2.7 Proteínas e Açúcares totais	65
4.2.8 Valor energético.....	66
4.3 Avaliação sensorial.....	66
5. Considerações finais e trabalho futuro	69
Bibliografia.....	89
Anexos.....	89
A - Determinação da Solubilidade Octanol-Água e Coeficiente de partição.....	89
A.1 - Curva de calibração para determinação da Solubilidade em Água	89
A.2 – Curva de calibração para determinação da Solubilidade em n-Octanol.....	91
B - Determinação do Teor de Minerais	93

B.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de Magnésio (Mg), Cálcio (Ca), Potássio (K) e Sódio (Na).....	93
C - Determinação do Teor de Açúcares Totais	96
C.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de Pentoses	96
C.2 - Curva de calibração para determinação da concentração de Hexoses.....	97

Índice de Tabelas

Tabela 2. 1 - Benefícios para a saúde de idosos pela inclusão de compostos bioativos em alimentos funcionais ^{11,26}	6
Tabela 2. 2 - Funções dos compostos bioativos ¹¹	7
Tabela 2. 3 - Exemplos de ensaios clínicos acerca do efeito de probióticos na saúde humana	9
Tabela 2. 4 - Exemplos de ensaios clínicos acerca do efeito de prebióticos na saúde humana	12
Tabela 2. 5 - Exemplos de ensaios clínicos acerca do efeito de simbióticos na saúde humana	13
Tabela 2. 6 - Compostos neuroprotetores de macroalgas e mecanismos envolvidos.....	19

Índice de Ilustrações

Figura 2. 1 - Macroalga <i>Codium tomentosum</i>	21
Figura 2. 2 - Representação de um lipossoma e respetiva bicamada lipídica ¹⁶⁴	26
Figura 2. 3 - Estrutura da Fosfatidilcolina ¹⁶⁵	27
Figura 2. 4 – Diferença estrutural entre fitossoma e lipossoma ¹⁷⁰	28
Figura 2. 5 - Deterioração em função da atividade da água ²⁰¹	36
Figura 3. 1 – [A] Conteúdo fenólico Total; [B] Produtos das reações de Maillard obtidos no estudo em estudo anterior realizado no GRAQ ¹²⁴	40
Figura 3. 2 - Distribuição de tamanho dos fitossomas por DLS produzidos nas condições ótimas encontradas em estudo prévio realizado no GRAQ	41
Figura 3. 3 - Preparação do Iogurte contendo respetivamente, 0% [A] 0,005% [B], 0,01% [C], 0,05% [D] 0,1% [E] e 0,2% [F] de extrato de <i>Codium tomentosum</i> e com 0,01% [G] e 0,15% [H] de extrato, mas adicionando também amora e framboesa desidratadas.	44
Figura 3. 4 – Estrutura dos Carboidratos: Hexose e Pentose	49
Figura 3. 5 - Reação química durante o ensaio de colorimetria.....	50
Figura 4. 1 - Estudo da solubilidade em água e n-Octanol do extrato <i>Codium tomentosum</i> e do Fitossoma	52
Figura 4. 2 - Espectro UV das amostras: [Vermelho] Fitossomas com fração F4; [Azul] Fração F4; [Verde] Fosfatidilcolina	53
Figura 4. 3 – Termogramas DSC: [Azul] Extrato; [Verde] Fosfatidilcolina; [Vermelho] Fitossomas com extrato;.....	54
Figura 4. 4 - Espectros FTIR: <i>Codium tomentosum</i> [a], L- α -Fosfatidilcolina [b], Complexo Fitossómico [c].....	56
Figura 4. 5 - Gráficos de % de inibição das colinesterases (AChE e BuChE) pelos iogurtes fabricados	58
Figura 4. 6 - Gráfico de % de inibição das colinesterases (AChE e BuChE) da F4 do extrato <i>Codium tomentosum</i> ¹²⁴	58
Figura 4. 7 - Comparação dos valores de pH das amostras de iogurte ao 4º e sétimo dia de armazenamento.....	59
Figura 4. 8 - Dispersão dos valores de acidez das amostras de iogurte	60

Figura 4. 9 - Comparação da alteração da percentagem de matéria orgânica, humidade e sinérese com o aumento da percentagem de extrato F4	61
Figura 4. 10 - Comparação do valor de Lípidos Totais e Peróxidos Lipídicos das amostras de iogurte produzidos.....	62
Figura 4. 11 - Concentração (mg/100mL) de minerais Cálcio (Ca), Fósforo (K), Magnésio (mg) e Sódio (Na)	64
Figura 4. 12 - Iogurtes fabricados com 0,005% [1], 0,01% [2], 0,05% [3], 0,10% [4] e 0,2% [5] de extrato <i>Codium tomentosum</i>	67
Figura 4. 13 - Iogurtes fabricados com 0,01% de extrato com [6] e sem [2] fruta desidratada e com 0,15% de extrato com fruta desidratada [7]	68
Figura 4. 14 - Iogurtes fabricados com 0,01% [8] e 0,15% [9] de extrato em fitossomas e 0,15% de extrato [10]	68

Lista de abreviaturas

AChE - Enzima acetilcolinesterase

ApoE3 - Apolipoproteína E

ATCI - ácido tricloroisocianúrico

Aw – Atividade da água

BTCl - Inibidor de tripsina/quimotripsina

BuChE - Enzima butirilcolinesterase

DA – Doença de Alzheimer

DHA - ácido docosa-hexaenoico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

DSC - Calorimetria de varredura diferencial

ELA - esclerose lateral amiotrófica

EPA - ácido icosapentaenóico

EROs - espécies reativas de oxigênio

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

IR - Infravermelho

OMS – Organização mundial de Saúde

PTFE – Politetrafluoretileno

PUFAs- Ácidos gordos poli-insaturados

ROS - Espécies de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

Tg – Temperatura de transição vítrea

UV – Ultravioleta

1. Introdução

Estima-se que o número de idosos, com mais de 60 anos, duplique até 2050 e mais do que triplique até 2100, passando para 2,1 mil milhões em 2050 e 3,1 mil milhões em 2100. Em Portugal, as projeções indicam que um em cada três portugueses terá mais de 65 anos em 2050. Espera-se também que o consumo de alimentos funcionais aumente na maioria dos países industrializados, por questões de conveniência, promoção da saúde, aumento da esperança de vida, acréscimo dos custos e aceitação da relação entre a alimentação e a saúde. ¹

Qualquer pessoa pode desenvolver uma doença neurodegenerativa, como a demência, doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP). No entanto, é mais comum acontecer após os 65 anos. A nível mundial, a demência afeta 1 em cada 80 mulheres, com idades compreendidas entre os 65 e 69 anos, sendo que no caso dos homens a proporção é de 1 em cada 60. Nas idades acima dos 85 anos, para ambos os sexos, a demência afeta aproximadamente 1 em cada 4 pessoas. ²

Diversos estudos demonstraram que a incorporação de algas marinhas e/ou isolados de algas marinhas nas dietas alimentares pode melhorar propriedades como a duração do período onde um alimento é seguro para consumo, tradicionalmente conhecido como a “validade”, o teor nutricional, textural, e aspetos sensoriais dos produtos finais. No entanto, os efeitos diferem de acordo com as espécies de algas marinhas e a quantidade utilizada na formulação. ³

A grande variedade de compostos bioativos identificados nas algas marinhas pode auxiliar na prevenção e tratamento de muitas doenças. Diversos estudos associam a menor incidência de diferentes doenças crónicas, como cancro, deficiência cardiovascular, diabetes, doenças neurodegenerativas, transtornos relacionados à obesidade e síndrome metabólica, com um perfil dietético que inclua o consumo de algas marinhas. ⁴

2. Estado da Arte

2.1 Alimentos funcionais

O conceito de alimento funcional nasce nos anos oitenta, no Japão, aquando da implementação de regulamentação que aprova alimentos que apresentem estudos comprovativos dos seus benefícios para a saúde. Estes benefícios devem-se ao facto destes alimentos, para além seu valor nutricional, conterem substâncias bioativas que desempenhem um papel específico nas funções fisiológicas do organismo humano. Desde aí, o Japão tem sido tradicionalmente responsável por cerca de metade das vendas de alimentos funcionais.⁵ No entanto esta proporção estará a diminuir à medida que os mercados europeu e americano se expandem.⁶

Nos anos de 2014 e 2015, de entre todos os produtos transacionados numa cadeia de hipermercados, onde estavam identificados 1.128 alimentos funcionais, foram contabilizadas 818.233 e 939.923 transações com pelo menos um alimento funcional, respetivamente. Estes alimentos funcionais estavam agregados em 5 segmentos homogéneos dos quais se destacam os iogurtes enriquecidos e leites fermentados com 727 produtos (correspondendo a 64,5%), 200 sumos e néctares, correspondendo a 17%, e 55 margarinas e cremes vegetais, correspondendo a 4,9%. Apresentaram, entre si, uma performance distinta verificando-se a preferência de compras dos iogurtes enriquecidos e leites fermentados, de aproximadamente 86% em ambos os anos.⁷

Todos os alimentos fornecem nutrientes e energia fundamentais para o suporte da vida, no entanto, estes só podem ser considerados funcionais se, para além do seu valor nutricional associado à composição química intrínseca de cada um, proporcionarem benefícios fisiológicos adicionais que contribuam para a prevenção ou tratamento de certos distúrbios metabólicos reduzindo o risco de doenças crónicas, ou promovendo a saúde do indivíduo. Sendo considerados como alimentos integrados na dieta ideal, estes não poderão ser um comprimido, uma cápsula ou um suplemento alimentar.⁸

O facto de a população estar cada vez mais envelhecida, ocasiona uma maior preocupação com a saúde, e fomenta o avanço das inovações tecnológicas, fatores que melhoram a receptividade do mercado para a introdução de novos alimentos com ação benéfica para a saúde em geral.⁹

Existem três classes principais de alimentos funcionais: os alimentos convencionais, os alimentos modificados e os alimentos sintetizados. Os alimentos funcionais convencionais são caracterizados por conterem substâncias bioativas naturais que possuam propriedades funcionais. Frutas e vegetais, como o tomate, framboesa, couve ou brócolos, são considerados

alimentos funcionais devido à sua composição com quantidades elevadas de licopeno, ácido elágico, luteína e sulforafano, respetivamente. Os alimentos modificados apresentam compostos bioativos provenientes de métodos de fortificação e enriquecimento, como por exemplo, os ovos e o leite enriquecidos com ácidos gordos ómega-3 e vitamina E. Os alimentos funcionais sintetizados são, por exemplo, os hidratos de carbono não digeríveis, que fornecem benefícios prebióticos, como os oligossacáridos ou o amido resistente.¹⁰

Portanto, um alimento funcional poderá tratar-se de um alimento natural, um alimento onde a natureza de um ou mais constituintes tenha sido modificado, um alimento ao qual foi adicionado um componente com características positivas, ou do qual foi removido um componente indesejável.⁶

Alimentos fortificados são aqueles aos quais foram adicionados nutrientes que não provêm naturalmente no alimento. Esses alimentos têm como objetivo melhorar o valor nutricional e promover benefícios à saúde.¹¹

Atualmente, o foco está direcionado para alcançarmos uma nutrição que maximize a esperança e qualidade de vida, pela identificação de ingredientes alimentares que quando adicionados a uma dieta melhorem a capacidade de resistir a doenças e melhorem a saúde. Os alimentos funcionais são um dos resultados desta visão atual.⁶

O crescimento deste mercado tem sido impulsionado pelas novas investigações sobre as ligações entre a dieta e a prevenção de doenças crónicas, pelo envelhecimento da população na maioria dos países desenvolvidos suscitando a preocupação crescente com este grupo etário mais propenso a doenças degenerativas, a pressão crescente sobre as despesas da saúde pública, o ênfase na consciência entre os consumidores e preocupação com a saúde dietética, as melhorias na ciência e tecnologia alimentar, assim como as alterações ao quadro regulamentar que rege esta temática.⁶

Recentemente, têm sido feitos grandes avanços no estudo dos compostos bioativos dos alimentos, devido ao reconhecimento da relação entre nutrição, saúde e doenças. No entanto, apesar das novas descobertas, ainda se mantém a questão acerca da diferença dos efeitos biológicos de um determinado composto bioativo administrado na sua forma isolada ou numa matriz alimentar. É necessário avaliar se esse composto poderá exercer uma ação sinérgica ou algum efeito antagónico com outros compostos presentes na matriz alimentar.¹²

Outro aspeto relevante na temática dos alimentos funcionais é a biodisponibilidade destes compostos e dos seus metabolitos a partir de diferentes matrizes alimentares, ou seja, quais as interações e dinâmica destes compostos posteriormente à sua ingestão e metabolização.¹² Por um lado, temos a bioacessibilidade que mede a proporção de um composto consumido numa

refeição após ser libertado da matriz alimentar durante a digestão e se torna acessível para absorção no intestino delgado ou para ser biotransformado pela microbiota intestinal. Já a bioatividade representa a atividade dos compostos absorvidos ou seus metabolitos nas vias metabólicas, resultando em efeitos biológicos no organismo. Por fim, a biodisponibilidade refere-se à quantidade de compostos que completam a rota de passagem pelo trato digestivo, são absorvidos e chegam aos tecidos-alvo na forma intacta ou metabolizada para realizar a sua ação ou para serem armazenados.¹³

Estudar a composição de um determinado alimento torna-se assim insuficiente para prever os seus benefícios para a saúde. Investigações realizadas nas últimas décadas demonstram que a noção de qualquer benefício à saúde estará sempre relacionada com a fração de compostos transferidos dos alimentos ingeridos para o organismo, uma vez que a absorção pode ser incompleta após o consumo oral.^{13,14}

Os mecanismos de ação dos compostos bioativos de alimentos são complexos e podem ter influência de diversos fatores. Em primeiro lugar, os fatores mais importantes que influenciam a estabilidade dos ingredientes bioativos nos alimentos passam pelo calor, luz, humidade, degradação enzimática, possibilidade de hidrólise, oxidação e solubilidade.¹⁵ Em segundo lugar, a questão da dose necessária a ser ingerida para um determinado composto bioativo exercer um efeito biológico é também muito relevante.¹² Por exemplo, a baixa solubilidade de compostos hidrofóbicos, como os carotenóides, dificulta muito a sua dissolução e absorção, tornando-se instáveis durante o processamento e armazenamento.¹⁵

Na área alimentar das principais superfícies comerciais não existe ainda uma secção específica de alimentos funcionais. Contudo, já há algumas referências a este tipo de alimentos nos sites de alguns hipermercados, sendo os mais populares: leites fermentados com bifidobactérias, que regulam o trânsito intestinal,¹⁶ iogurtes e sobremesas que contribuem para o crescimento e desenvolvimento ósseo das crianças,¹⁷ leites e cremes para barrar que prometem manter o coração saudável pela redução ativa do colesterol,¹⁸ cereais ricos em fibras e pouco calórico,¹⁹ leites em pó ricos em cálcio, vitaminas e proteínas,²⁰ sumos antioxidantes,²¹ leites que reduzem o colesterol, como o leite de aveia, ricos em fibras, cálcio e ómega 3, e os sem lactose,²² assim como ovos ricos em ómega 3.²³

No futuro, uma grande variedade de produtos alimentares são ou serão caracterizados como alimentos funcionais, afetando diversas funções corporais relevantes quer para um estado de bem-estar e saúde ou para a redução do risco de desenvolver uma doença.⁶

Se por um lado, nos Estados Unidos da América, a aceitação dos alimentos funcionais é bastante superior à dos consumidores europeus, que são mais céticos relativamente aos

benefícios deste tipo de produto, por outro lado, existem diferenças no consumo entre os habitantes dos vários países da Europa, sendo estes alimentos bastante populares na Finlândia, Suécia, Países Baixos, Polónia, Espanha e Chipre, ao contrário do que acontece na Dinamarca, Itália e Bélgica.²⁴

De uma forma geral, os consumidores mais velhos parecem ter um maior interesse por alguns alimentos funcionais, em particular, relacionados com as patologias de que sofrem ou que querem prevenir.^{24,25} Atualmente já existem estudos que evidenciaram efeitos benéficos na nutrição de idosos pela introdução de compostos bioativos em alimentos funcionais, conforme os exemplos apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Benefícios para a saúde de idosos pela inclusão de compostos bioativos em alimentos funcionais^{11,26}

Composto bioativo	Alimento Funcional	Benefício para a saúde
Proteína	Soja	Reduzir o colesterol
Ácidos gordos – ómega 3	Peixe gordo	Reduzir doenças cardíacas, mortes cardíacas e enfarte do miocárdio
Probióticos	Laticínios fermentados	Melhoria da função da microbiota intestinal; Aumentar a imunidade; Reduzir o aumento de peso corporal; Reduzir a hipertensão e hiperglicemia
Prebióticos	Chicória, cebola e alho	Reduzir sintomas de depressão e aterosclerose; Efeito bifidogénico
Compostos fenólicos	Uvas, mirtilos, linhaça, brócolos	Prevenir e/ou tratar hiperuricemia e/ou gota; Reduzir o risco de diabetes, osteoporose e doença hepática; Reduzir a probabilidade de doenças cardiovasculares
Simbióticos	Granolas e chocolates	Melhoria dos marcadores de inflamação; Aumento dos níveis de glutathiona no sangue; Reduzir a hipertensão e da hiperglicemia

Contudo, o sucesso dos alimentos e bebidas com benefícios para a saúde estará sempre dependente duma relação de confiança por parte dos consumidores.

2.2 Compostos Bioativos

Existem vários componentes bioativos, os probióticos, prebióticos, ácidos gordos, vitaminas, antioxidantes, carotenoides, compostos fenólicos e fibras alimentares que integram os alimentos funcionais. ²⁷ Quando integrados em alimentos funcionais estes compostos bioativos apresentam ações chave para o organismo humano, identificadas na Tabela 2.2.

Tabela 2. 2 - Funções dos compostos bioativos ¹¹

Composto Bioativo	Função
Probióticos	Melhoram a saúde gastrointestinal
Ácidos gordos	Contribuem para a manutenção da função mental e visual
Vitaminas	Contribuem para a manutenção de uma visão saudável, função imunológica e saúde óssea
Compostos fenólicos	Neutralizam radicais livres, que podem danificar as células; reforçam as defesas antioxidantes celulares
Carotenoides	Neutralizam os radicais livres, que podem danificar as células; contribuem para a manutenção de uma visão saudável;
Fibra	Contribuem para a manutenção de um trato digestivo saudável; reduzem o risco de doença cardíaca coronária e alguns tipos de cancro; contribuem para a manutenção de níveis saudáveis de glicose no sangue

2.2.1 Probióticos

O termo “probiótico” deriva da língua grega e significa “para a vida”. Foi usado primeiramente por Lilly e Stillwell em 1965 para descrever "substâncias secretadas por um microorganismo que estimulam o crescimento de outro". Em 1971, Sperti aplica o termo a extratos de tecido que estimulam o crescimento microbiano. No entanto, foi Parker o primeiro a usar o termo probiótico no sentido em que ele é usado hoje, definindo-o como "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal". ²⁸

A definição atual, formulada em 2002 por especialistas da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* e da *World Health Organization*, afirma que os probióticos são “células vivas de microrganismos estritamente selecionados que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. Mais tarde em 2013 a definição foi mantida pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos.

29

São conhecidos também como bio terapêuticos, bio protetores e bio profiláticos, sendo utilizados para prevenir as infeções entéricas e gastrointestinais.³⁰

Conhecem-se ainda cada vez mais evidências que apoiam o uso de várias estratégias que modulam a microbiota intestinal para exercer alterações neurológicas e psicológicas como a utilização de probióticos como uma intervenção natural e dietética para a saúde do cérebro.³¹ Isto deve-se ao facto de a microbiota intestinal ser capaz de influenciar a atividade cerebral através da atividade imune/humoral ou do nervo que conecta os neurónios intestinais com os do sistema nervoso central. Assim, é possível que um tratamento adjuvante com pré/probióticos possa prevenir e/ou curar a disbiose intestinal e, assim, permitir que os efeitos terapêuticos dos fármacos para doenças como a DA sejam explorados de forma mais completa.³²

A seleção destes microrganismos para uso alimentar deve obedecer a critérios como, pertencer à flora intestinal humana, não conferir patogenicidade, ser tolerável pelo trato gastrointestinal, possuir capacidade de sobreviver aos processamentos necessários, permanecer viável durante o tempo de vida útil do alimento integrante e os seus benefícios devem ser previamente comprovados cientificamente.³³⁻³⁵

Na prática, existem inúmeras formas de integrar probióticos em produtos industriais, isolados ou combinados com outros microrganismos, em alimentos, medicamentos ou em suplementos de dietéticos.²⁷

Os principais benefícios dos probióticos para a saúde passam pela diminuição da obstipação, ocorrência de gastroenterite, o aumento da defesa da flora intestinal contra organismos patogénicos, a prevenção do cancro do cólon, a diminuição das reações alérgicas e da pressão arterial³⁶

O microbioma gastrointestinal possui a maior e mais complexa comunidade de espécies de bactérias conhecidas no organismo humano, podendo variar de acordo com inúmeros fatores como a alimentação durante a infância, o uso de antibióticos, a idade, fatores genéticos e a dieta. Esta comunidade bacteriana desempenha funções de simbiose com o hospedeiro, tais como a manutenção da barreira epitelial, a inibição da adesão de agentes patogénicos à superfície intestinal e a adaptação do sistema imunitários.¹²

A composição do microbioma intestinal está em constante mutação sob influência de fatores como a dieta, medicamentos ingeridos, mucosa intestinal, sistema imunitário e a própria microbiota. Variações naturais, como o stress oxidativo ou secreção de toxinas bacterianas, podem levar à sua deterioração, criando um estado de disbiose. A disbiose intestinal está associada ao risco de desordens intestinais como doenças metabólicas, obesidade, diabetes, cancro colorretal, doenças inflamatórias e autoimunes.³⁷

Neste contexto, os alimentos funcionais contendo probióticos podem exercer efeitos benéficos sobre a composição ou atividade microbiana intestinal do hospedeiro permitindo reconstruir esta comunidade e restaurar as suas interações.¹² Na Tabela 2.3 apresentam-se alguns exemplos de ensaios clínicos que estudaram o efeito dos probióticos na saúde humana.

Tabela 2.3 - Exemplos de ensaios clínicos acerca do efeito de probióticos na saúde humana

Doença	Microorganismo	Tempo de ensaio	Resultado Principal
Obesidade	<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055 em leite fermentado ³⁸	12 semanas	Redução dos valores de índice de massa corporal e pressão arterial
	<i>Lactobacillus plantarum</i> em queijo ³⁹	3 semanas	
Diabetes tipo 2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5, <i>Bifidum lactis</i> Bb12 em iogurte	6 semanas	Melhoria do colesterol total e do colesterol de lipoproteína de baixa densidade ⁴⁰
	<i>L. plantarum</i> A7 em leite de soja	8 semanas	Processo de metilação diminuído ⁴¹
Diferentes tipos de câncer e seus efeitos colaterais	<i>L. plantarum</i> CGMMCC No 1258, <i>L. acidophilus</i> LA- 11, <i>Bifidum longum</i> BL-88 em cápsula	16 dias	Melhoria da integridade da barreira da mucosa intestinal e diminuição das complicações de infecções ⁴²
	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> em suplemento alimentar	7 semanas	Redução da incidência de diarreia e melhoria consistência das fezes ⁴³

Efeito neuroprotetor	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>B. longum</i> + <i>Bifidobacterium adolescentes</i> + prébióticos (frutooligosacáridos)	12 semanas	A decorrer até janeiro de 2023. Pretende-se avaliar o efeito dos probióticos nos mecanismos de neuroinflamação por monitorização do sistema imune periférico de pacientes com doença de Parkinson. Para além disso, também serão monitorizados os sintomas motores e não motores destes pacientes. ⁴⁴
	<i>Bifidobacterium breve</i> Bv-889, <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> BLI-02, <i>B. bifidum</i> Bf-688, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CP-9, <i>L. plantarum</i> PL-02	12 semanas	A decorrer até junho de 2023 com pacientes com DA. Os parâmetros a monitorizar são: função cognitiva, comportamento, padrão de sono, fluxo sanguíneo cerebral, marcadores sanguíneos, e variações na flora fecal. ⁴⁵

Os mecanismos de ação dos probióticos podem ocorrer em três níveis. O primeiro ocorre no lúmen intestinal, onde as bactérias probióticas interferem com o crescimento ou sobrevivência de microrganismos patogénicos por exclusão competitiva. No segundo nível, bactérias probióticas interagem com o muco intestinal e o epitélio, sendo capazes de aumentar a função de barreira e a resposta imunitária da mucosa. Já no terceiro nível, atuam na resposta imunitária sistémica e em órgãos, como o cérebro ¹².

2.2.2. Prebióticos

Em 1995, Gibson e Roberfroid definiram os prebióticos como componentes alimentares não digeríveis que, por meio da estimulação do crescimento ou atividade de um único tipo ou de uma quantidade limitada de microrganismos residentes no trato gastrointestinal, melhoram a condição de saúde do hospedeiro.⁴⁶

Em 2004 a definição é alterada para componentes seletivamente fermentados que permitem alterações específicas na composição e/ou atividade de microrganismos no trato gastrointestinal, benéficas para a saúde e bem-estar do hospedeiro.⁴⁷

Atualmente, a organização mundial da saúde (OMS) define prebióticos como oligossacarídeos não digeríveis, porém fermentáveis, cuja função visa mudar a atividade e a composição da microbiota intestinal, numa perspectiva de promover a saúde do hospedeiro. Estes compostos afetam de forma seletiva a flora intestinal, melhorando as suas características, não são hidrolisados na cavidade bucal pela saliva, não são afetados pela hidrólise ácida gástrica, não sofrem hidrólise enzimática no intestino delgado, chegando praticamente intactos ao intestino grosso onde são fermentados pelas bifidobactérias, estimulando o seu crescimento.

27

Embora estes substratos mais atuais sejam administrados por via oral, eles também podem ser administrados diretamente em outros locais do corpo, como o trato vaginal e a pele. Além disso, os efeitos na saúde conferidos pelos prebióticos incluem benefícios para o trato gastrointestinal, cardiometabólicos, saúde mental e óssea, entre outros.¹²

A fibra alimentar é um dos principais exemplos. Os seus efeitos estão relacionados, em parte, com o facto de que uma parcela da fermentação dos seus componentes ocorrer no intestino grosso, o que produz impacto sobre a velocidade do trânsito intestinal, sobre o pH do cólon e sobre a produção de subprodutos com importante função fisiológica. Indivíduos com elevado consumo de fibras apresentam menor risco para o desenvolvimento de doença coronariana, hipertensão, obesidade, diabetes e cancro de cólon.⁴⁸

Habitualmente, consideram-se cinco critérios básicos para a classificação de componentes alimentares como os prebióticos.⁴⁹ O primeiro critério assume que os prebióticos não são digeridos, ou que são apenas parcialmente digeridos. Como consequência, eles atingem o cólon, onde são seletivamente fermentados por bactérias potencialmente benéficas, requisito do segundo critério.⁵⁰ A fermentação aumenta a produção ou potencia a mudança da abundância relativa de diferentes ácidos gordos de cadeia curta, o aumento da quantidade fecal, a redução moderada do pH do cólon, e melhora o sistema imunológico, beneficiando o hospedeiro, requisito do terceiro critério.²⁹ A estimulação seletiva do crescimento e atividade

das bactérias intestinais potencialmente associadas à proteção da saúde e bem-estar é considerada outro critério. O último critério da classificação pressupõe que um prebiótico deve ser capaz de resistir às condições de processamento de alimentos e permanecer inalterado, não degradado ou quimicamente inalterado e disponível para o metabolismo bacteriano no intestino.

49

Ressalva-se que a estabilidade a longo prazo durante a vida de prateleira de alimentos, bebidas e rações, a resistência ao processamento e as propriedades físicas e químicas que exibem um efeito positivo no sabor e na consistência dos produtos tornam os prebióticos bastante competitivos face aos probióticos.²⁹

A presença de prebióticos na dieta pode levar a inúmeros benefícios para a saúde, conforme alguns ensaios clínicos apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Exemplos de ensaios clínicos acerca do efeito de prebióticos na saúde humana

Doença	Microorganismo	Tempo de ensaio	Resultado Principal
Obesidade	Oligofrutose	12 semanas	Redução do peso corporal e diminuição da glicose ⁵¹
Intolerância à lactose	Galactooligossacarídeos	36 dias	Melhorias em sintoma como: dor, inchaço, diarreia, cólicas ou flatulência. Aumento das populações de bifidobactérias ⁵²
Câncer colorretal e efeitos colaterais	Inulina	Sem dados	Inibição do crescimento e indução de apoptose do carcinoma colorretal humano ⁵³
Efeito neuroprotetor	Barra pré-biótica	10 dias	Modulação da flora intestinal em pacientes com doença de Parkinson. ⁵⁴

2.2.3 Simbióticos

A palavra “simbiótico” implica sinergias, e portanto, o termo é empregue para produtos onde um componente prebiótico favorece seletivamente um microrganismo probiótico. Assim, estes produtos têm propriedades probióticas e prebióticas, criados para superar as dificuldades de sobrevivência dos probióticos no trato gastrointestinal²⁹

Considerando o número de combinações possíveis, a aplicação de simbióticos para a modulação da microbiota intestinal em humanos parece promissora. Quanto à sua eficácia terapêutica estes apresentam efeitos antibacterianos, anticancerígenos e antialérgicos. Eles também neutralizam os processos de decomposição no intestino e previnem a obstipação e a diarreia, podem ainda ser altamente eficientes na prevenção da osteoporose, redução dos níveis de gordura e açúcar no sangue, regulação do sistema imunológico e tratamento de distúrbios cerebrais associados à função hepática,^{55 56} conforme ensaios clínicos apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2. 5 - Exemplos de ensaios clínicos acerca do efeito de simbióticos na saúde humana

Doença	Composição do simbiótico	Tempo de ensaio	Resultado Principal
Obesidade	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CGMCC1.3724, inulina	36 semanas	Perda de peso e redução da leptina. Aumento em Lachnospiraceae ⁵⁷
Diabetes tipo 2	<i>Lactobacillus sporogenes</i> , inulina	8 semanas	Diminuição do perfil lipídico sérico (TAG, TC/HDL-C) e aumento significativo dos níveis séricos de HDL-C. ²⁹

2.2.4 Ácidos gordos ômega-3

Os ácidos gordos podem ser classificados de acordo com o grau de saturação das moléculas de carbono em saturados, monoinsaturados e polinsaturados (PUFA). Os ácidos gordos ômega-3 são PUFA, e a primeira insaturação ocorre no terceiro carbono a partir da extremidade com o grupo metilo terminal. Já os ácidos gordos da série ômega-6 possuem a primeira insaturação no carbono 6.⁵⁸

A maior fonte de ácidos gordos polinsaturados na alimentação era obtida até à data, através do peixe e igualmente de óleos vegetais como milho ou óleo de soja. Assiste-se, todavia, ao crescente declínio do stock global de peixe devido não só à generalização dos métodos de pesca, mas também à crescente contaminação dos mares e rios com a inúmera variedade de poluentes.^{59,60}

A maioria da população global carece desta classe de compostos ativos. Em particular, o ácido docosahexaenóico (DHA), um ácido gordo ômega-3 de cadeia longa relevante para o

desenvolvimento do cérebro e dos olhos. O DHA desempenha um papel significativo na saúde mental durante a primeira infância e até na idade adulta, e no cérebro, na fluidez da membrana celular, função e libertação de neurotransmissores. Uma baixa ingestão de ómega-3 aumenta o risco de vários problemas de saúde mental, incluindo transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, autismo, transtorno bipolar e depressão. Estudos que fornecem suplementação com ómega-3 marinho mostraram-se um efeito benéfico na saúde mental. ⁶¹

Por outro lado, é importante ter em consideração que os ácidos gordos não são produzidos pelo peixe, mas sim pelas algas marinhas acumuladas ao longo da cadeia trófica. ^{62,63} Como tal, o consumo de algas por humanos é uma alternativa viável para a obtenção destes compostos. ⁶⁴

Os efeitos anti-inflamatórios dos ácidos gordos ómega-3 têm sido extensivamente investigados e estudos epidemiológicos já demonstram uma associação inversa entre o consumo destes ácidos gordos e diversos marcadores inflamatórios. ⁵⁸

2.2.5 Vitaminas antioxidantes

Para combater o stresse oxidativo que surge pela acumulação de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio que provocam danos irreversíveis nas estruturas das biomoléculas de ADN, proteínas, hidratos de carbono e, em menor extensão, a outros componentes celulares, podemos recorrer a antioxidantes, que atuam diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participam indiretamente nos sistemas enzimáticos com essa função. ⁶⁵

A quantidade relativa de antioxidantes na dieta influencia a suscetibilidade de um indivíduo desenvolver o stresse oxidativo. A vitamina E é a principal vitamina antioxidante transportada na corrente sanguínea pela fase lipídica das partículas lipoproteicas e encontra-se predominantemente nos óleos vegetais. ⁶⁵

Outro exemplo, a vitamina C, presente em todos os frutos e vegetais é considerado um excelente antioxidante natural auxiliando na prevenção do desenvolvimento de tumores e danos causados pela excessiva exposição à radiação e toma de medicamentos. Atualmente, esta vitamina pode ainda ser adicionada a muitos alimentos processados com o intuito de inibir a formação de metabolitos de óxido nítrico carcinogénicos. ⁶⁶

A vitamina C é considerada uma molécula antioxidante vital no cérebro ajudando a manter a integridade e a função de vários processos no sistema nervoso central (SNC), incluindo maturação e diferenciação neuronal, formação de mielina, síntese de catecolaminas, modulação da neurotransmissão e proteção antioxidante. Como as doenças neurológicas são caracterizadas pelo aumento da geração de radicais livres e as maiores concentrações de vitamina C no corpo

são encontradas no cérebro e nos tecidos neuroendócrinos, pressupõe-se que esta consiga alterar o curso de doenças neurológicas e apresentar potenciais papéis terapêuticos.⁶⁷

Alguns estudos concluíram que a vitamina E pode desempenhar um papel protetor na neurodegeneração em relação a doenças como a DA, a DP, acidente vascular cerebral e esclerose lateral amiotrófica (ELA).⁶⁸

2.2.6 Carotenoides

Os carotenoides, tetraterpenos (C40), são pigmentos presentes na natureza, com mais de 600 estruturas caracterizadas, abundantes em alimentos de cor amarela, vermelha ou laranja, como é o caso de frutas e vegetais (ex.: abóbora, tomate e a laranja), podem ser extraídos de fungos e flores, podendo ser comercializados como corantes alimentícios.

Os carotenos, os precursores da vitamina A, e o licopeno são os principais tipos de carotenoides descritos como agentes antioxidantes, apresentando uma ação protetora contra o cancro e doenças cardiovasculares, capazes de inibir a aterosclerose, um tipo particular de arteriosclerose, que afeta sobretudo os grandes vasos e que está na base das doenças arteriais mais comuns, como a hipertensão arterial, a doença coronária, o aneurisma da aorta ou a doença arterial dos membros inferiores.⁶⁵

Os carotenoides também atuam como antioxidantes que reduzem os subprodutos reativos, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a fotossíntese, protegendo o aparelho fotossintético de danos oxidativos. Além disso, os carotenoides desempenham vários outros papéis na natureza, incluindo o desenvolvimento e a sinalização do stresse oxidativo em plantas, padrões de coloração relacionados ao sexo e como precursor da vitamina A em muitas espécies.⁶⁹

Os carotenoides podem ainda inibir o aparecimento de doenças neurodegenerativas através de uma variedade de mecanismos. No caso da DA, foi demonstrado que, através da supressão de ROS, efeitos anti neuroinflamatórios, atividade de anti agregação da beta-amiloide e regulação da sinalização induzida por oligómero beta-amiloide, os carotenoides melhoram a disfunção mitocondrial, stresse oxidativo, neuroinflamação sustentada e metabolismo lipídico prejudicado, todos criticamente associados com a patogênese da DA.⁷⁰

2.2.7 Fibras alimentares

As fibras alimentares, conhecidas como fibras dietéticas, resistem à ação das enzimas digestivas humanas. A sua importância está relacionada com a regulação das funções

intestinais, nomeadamente trânsito intestinal, volume fecal, prevenção de doenças, como diverticulite, hiperlipidemia, obstipação, hiperglicemia e cancro de intestino grosso.⁷¹

A ingestão regular e adequada de fibras tem demonstrado ser eficaz na redução de risco de várias doenças como: aterosclerose e doença coronária, acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes *mellitus* e algumas desordens gastrointestinais.⁷¹⁻⁷⁷ As fibras são encontradas principalmente em frutas, legumes e verduras, em geral, e em cereais integrais (arroz integral, chia, quinoa, aveia, farelo de trigo, semente de linhaça).⁷⁸

O baixo teor de fibra e a falta de antioxidantes na dieta afetam negativamente o resultado de certos distúrbios neurológicos. Intervenções dietéticas podem desempenhar um papel na fisiopatologia de distúrbios neurológicos comuns, como DA, DP, acidente vascular cerebral, enxaqueca, esclerose múltipla e epilepsia.⁷⁹

2.2.8 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias encontradas em abundância na Natureza. Nesse sentido, é relevante destacar que mais de 8000 compostos fenólicos já foram descobertos em frutas e hortaliças, e frequentemente são associados a dietas saudáveis e à prevenção de diversas doenças crónicas devido às propriedades antioxidantes desses compostos.⁸⁰

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam grupos hidroxilo e anéis aromáticos, com formas simples ou poliméricas, o que lhes confere poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas como açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural.⁸¹

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes, não exclusivamente pelo facto de doarem hidrogénio ou eletrões, mas pelos seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lípidos.⁸²

A presença de compostos fenólicos na dieta, de forma regular, pode fornecer benefícios à saúde associados à redução do risco de desenvolver doenças crónicas.⁸³ Avanços recentes demonstraram que vários compostos fenólicos podem reduzir o risco e retardar distúrbios relacionados com o envelhecimento, incluindo doenças neurodegenerativas, síndromes metabólicas e cancros, particularmente pela modulação das vias de sinalização envolvidas na inflamação, danos oxidativos, autofagia e apoptose. Assim, os fitoquímicos vegetais, como os

compostos fenólicos, são considerados potenciais agentes antienvhecimento devido às suas ações bioquímicas multi-alvo. ⁸⁴

2.3 Macroalgas

As algas fazem parte de um grupo heterogêneo de organismos fotossintéticos. Como organismos multicelulares, as macroalgas ou algas marinhas, atingem até 60 metros de comprimento, como organismos unicelulares, também conhecidos como microalgas, medem de 1 milímetro a vários centímetros. Uma maneira de classificar macroalgas é com base na sua pigmentação, existindo algas castanhas, algas vermelhas e algas verdes. ⁸⁵

Apresentam alto teor em compostos com diferentes atividades biológicas, incluindo compostos orgânicos complexos e metabólitos primários e secundários. Entre eles, ácidos gordos polinsaturados, compostos fenólicos, vitaminas, entre outros. Evidenciam-se como uma fonte viável, além de econômica, de biomassa de compostos valiosos com aplicações potenciais nas indústrias nutracêutica, farmacêutica, química, alimentar e cosmética devido às suas propriedades biologicamente ativas e regenerativas. ^{3,85-87}

Entre 2010 e 2020 o uso de diferentes macroalgas marinhas como fontes de compostos bioativos teve a vantagem de explorar um recurso natural renovável subutilizado. ⁴

As algas marinhas têm evoluído para sobreviver a muitas alterações e ameaças ambientais e de predadores. Elas enfrentam continuamente altas concentrações de agentes infecciosos e incrustantes que são nativos das águas oceânicas, acabando por desenvolver certos mecanismos de defesa, como a produção de compostos bioativos. ⁸⁸

A composição química da macroalga varia consideravelmente devido tanto às condições ambientais (intensidade de luz, habitat de crescimento, salinidade da água do mar, temperatura) quanto a diferenças genéticas entre as espécies. ⁸⁸ Apresentam um teor proteico que pode variar de 7 a 31% de peso seco e um teor lipídico variando de 2 a 13% de peso seco. ⁸⁹ Uma quantidade considerável de hidratos de carbono também pode ser encontrada em macroalgas (até 32-60% de peso seco), assim como vitamina A, B e E. ⁹⁰⁻⁹²

As variedades de algas marinhas que possuem alto teor de proteína podem ser utilizadas como ingredientes no processo de fabrico de diversos alimentos. ³

O conteúdo lipídico é relativamente baixo nas espécies de macroalgas. Variações na quantidade e no perfil de ácidos gordos são associadas tanto a diferenças ambientais, como a intensidade luminosa, salinidade da água do mar ou temperatura, quanto a diferenças genéticas entre as espécies. Em geral, observou-se que as espécies castanhas apresentam maior teor de lípidos em comparação com as verdes. ⁹³ O ácido icosapentaenóico (EPA) e o DHA são

considerados os dois PUFAs mais importantes dos lípidos marinhos, uma vez que estão intrinsecamente relacionados a importantes efeitos biológicos, como proteção cardiovascular, anti-inflamatório e anticancerígeno. ^{94,95}

Os hidratos de carbono, são considerados uma fonte importante e insubstituível de energia necessária para suportar as diferentes funções do corpo humano e a sua atividade física. ⁴ Destes, os polissacarídeos das algas, apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, entre as quais as atividades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. ⁹⁶

Os compostos fenólicos das macroalgas também tem ganho especial atenção devido às suas bioatividades específicas e benefícios de promoção da saúde, incluindo propriedades antioxidantes, antiproliferativas, antimicrobianas, antialérgicas, antidiabéticas e neuroprotetoras. ⁹⁷⁻⁹⁹

Além de carnes e produtos de panificação, vários estudos avaliaram o efeito da adição de algas marinhas nas propriedades nutricionais, texturais e sensoriais de outros produtos alimentares. Por exemplo, recentemente, foram produzidos novos produtos lácteos pela adição de extratos de algas marinhas avaliando-se o impacto no aspeto final do produto. Como exemplo, foi relatado que o verde e o amarelecimento das amostras de leite fortificado aumentaram pela adição de extratos etanólicos preparados a partir de algas, proporcionando, no entanto, funcionalidade antioxidante semelhante ao padrão floroglucinol. Além disso, o tipo ou concentração de extrato de algas marinhas não teve influência nos parâmetros de qualidade, por exemplo, na microbiologia, e a avaliação sensorial mostrou que o extrato foi aceite como ingrediente funcional no leite. Extratos de algas marinhas mostraram-se estáveis no leite, concluindo-se que a sua adição pode melhorar certas qualidades do leite e características de vida de prateleira. ¹⁰⁰

Relativamente às algas verdes, estudos mostraram que estas apresentam um elevado teor em hidratos de carbono permitindo-lhes utilizações em fermentações, razão pela qual na indústria farmacêutica estas algas têm sido aproveitadas como vermícidas (em fármacos para expelir vermes do trato gastrointestinal) ou no tratamento da gota. ¹⁰¹

Grande quantidade de polissacarídeos, especialmente os presentes nas paredes celulares são extraídos pela indústria de hidrocolóides: alginato de algas castanhas, carragenana e ágar de algas vermelhas. Contêm também polissacarídeos de armazenamento como a laminarina nas algas castanhas e o amido florídeo nas algas vermelhas. Grande parte destes polissacarídeos não são digeridos pelo sistema digestivo dos humanos, pois as enzimas destes não conseguem quebrar as macromoléculas que os constituem e, assim, podem ser considerados como fibras dietéticas. Os lípidos representam apenas entre 1-5% do peso seco das algas, mas oferecem uma

composição em PUFA muito interessantes. As algas marinhas também contêm carotenoides (como o β -caroteno, luteína e violaxatina nas algas vermelhas, fucoxantina nas algas castanhas) e terpenoides. Em relação, por exemplo, a polifenóis os níveis mais elevados são encontrados nas algas castanhas, onde o florotanino pode variar entre 5 e 15% do peso seco. ^{101,102}

As algas castanhas são edíveis, podendo ser usadas como alimento, no entanto, o seu grande potencial deriva dos seus extratos, úteis, por exemplo, para tratamentos anti-inflamatórios e na perda de peso. Estas algas são estruturalmente constituídas por celulose e polissacarídeos estruturais e as suas reservas de alimento constituídos por polímeros de hidratos de carbono. Contém também polissacarídeos, polifenóis, oligoelementos e minerais, potássio, bromo, cloro, magnésio, cálcio, ferro, manitol, silício, iodo, vitaminas, e pró-vitaminas A e D, ácido ascórbico (vitamina C) e lípidos. Devido a todas estas características, estas algas são utilizadas no tratamento de processos reumáticos, arteriosclerose, transtornos menstruais, hipertensão, úlceras gástricas, bócio, doenças da pele, sífilis e possuem também efeito anticoagulante. ¹⁰³

A grande variedade de compostos bioativos integrantes das algas marinhas podem auxiliar na prevenção e tratamento de muitas doenças. Já existem estudos epidemiológicos, clínicos e de meta-análise que associam a menor incidência de diferentes doenças crónicas, como cancro, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, transtornos relacionados à obesidade e síndrome metabólica, com um perfil dietético que inclua o consumo de algas marinhas. ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por fenómenos complexos e profundamente correlacionados, como a neuroinflamação, danos oxidativos causados por ROS, perda de sinapse e outras vias potenciais de morte celular neuronal. ¹⁰⁷ A atividade neuroprotetora das algas marinhas está relacionada com uma vasta classe de compostos, como polissacarídeos, proteínas, lípidos, pigmentos ou polifenóis. Muitos destes compostos isolados de macroalgas demonstraram exercer efeitos neuroprotetores através de uma multiplicidade de mecanismos, como mostram os exemplos apresentados na Tabela 2.6. ¹⁰⁸

Tabela 2. 6 - Compostos neuroprotetores de macroalgas e mecanismos envolvidos

Classe	Composto	Efeitos neuroprotetores
Polifenóis	Floroglucinol	Supressão da superprodução de ROS intracelulares, diminuição dos níveis de cálcio intracelular e redução da morte celular ¹⁰⁹

Florotaninos	Dieckol	Atividade inibitória contra AChE ¹¹⁰ Supressão da superprodução de ROS intracelulares, diminuição dos níveis de cálcio intracelular e redução da morte celular ¹⁰⁹
	DPHC	Atividade inibitória moderada contra BuChE ¹¹¹ Mecanismos antioxidantes e controlo dos níveis intracelulares de cálcio ¹¹²
Carotenoides	Fucoxantina	Inibição da formação de ROS intracelular, danos no DNA e apoptose induzida por peróxido de hidrogénio ¹¹³
Ácidos gordos	DHA	Atividade inibitória contra AChE ^{114,115}

▪ **Macroalga *Codium tomentosum* Stackhouse**

Estima-se que as doenças neurodegenerativas superem o cancro como causa mais comum de morte entre os idosos, razão pela qual a procura de novos agentes neuroprotetores mais seguros e eficazes que possam ser utilizados na terapia de doenças neurodegenerativas tenha crescido exponencialmente nos últimos anos. ^{116,117}

Os produtos naturais obtidos a partir de organismos marinhos têm-se demonstrado uma fonte potencial de novos agentes terapêuticos, nos quais as macroalgas foram incluídas devido à sua capacidade de produzir compostos bioativos relevantes, derivados principalmente do seu metabolismo secundário, desenvolvido como forma de defesa contra as variações ambientais e predadores. ^{116,118}

Recentemente, foram isolados numerosos compostos anti-inflamatórios de algas marinhas com potencial eficácia protetora contra a neuroinflamação, como os hidratos de carbono, lípidos, proteínas, aminoácidos e compostos fenólicos. ¹¹⁹

Codium tomentosum é uma macroalga verde da família Codiaceae, com ramificações finas e estrutura cilíndrica, conforme Figura 2.1, conhecida em Portugal como o “chorão do mar”. Pode ser encontrada ao longo de toda a costa, atingindo o seu pico de crescimento no final do verão ou início do outono quando as condições de temperatura e luminosidades são mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Adicionalmente, é uma espécie comestível e que está a ser cultivada em sistemas de aquacultura, pelo que é uma fonte adequada para exploração sem impacto negativo nos ecossistemas marinhos. ¹²⁰



Figura 2. 1 - Macroalga *Codium tomentosum*

Em 2020 foi efetuado um estudo do potencial neuroprotetor de frações de *Codium tomentosum* evidenciando a sua capacidade para promover a recuperação celular da toxicidade induzida no cérebro por ROS. ¹²¹

Em 2021, frações da alga verde *Codium tomentosum*, apresentaram novamente capacidade de proteger as células neuronais dos efeitos nocivos provocados por 6-OHDA, um composto orgânico neurotóxico usado para destruir seletivamente neurónios, neutralizando a sua citotoxicidade. O 6-OHDA é um agente agressor usado em modelos celulares para mimetizar características histológicas e bioquímicas da doença de Parkinson. Além disso, este estudo sugeriu que a fração da *Codium tomentosum* atua através de diferentes mecanismos relacionados com a doença de Parkinson, reduzindo o stress oxidativo, prevenindo a disfunção mitocondrial e bloqueando as vias inflamatórias, evitando assim a morte celular neuronal. ^{122,123}

A composição química desta alga já foi estudada por alguns autores que obtiveram os valores de humidade próximos dos obtidos para outras algas, de $9,0 \pm 0,2$ g/100 g dw, o conteúdo lipídico de $22 \pm 0,1$ g/100 g (dw) ¹²⁴ face a um conteúdo lipídico total noutras algas de $3,6 \pm 0,2$ g/100 g (dw). ¹²⁵ A alga apresentou um teor relativamente alto de cinzas, associado à alta concentração de minerais característica das algas marinhas ¹²⁶, comparável com outros valores relatados na literatura de $35,99\% \pm 0,48$ ¹²⁵ O teor de proteína é conhecido por ser tendencialmente superior em algas verdes e vermelhas 10-47% (dw) ¹²⁷ variando ao longo do ano dependendo da área geográfica e das condições ambientais ¹²⁸, estando de acordo com o obtido de $25,3\% \pm 0,2$. O género *Codium* também é conhecido por conter ácidos gordos n-carboxílicos, carotenoides, metabolitos halogenados e outros compostos bioativos. ¹²⁹⁻¹³¹

2.4 Neuroproteção e nanoencapsulamento

A neuroinflamação é um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento e progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA e a DP. No entanto, até ao momento

não há terapias farmacológicas capazes de retardar ou parar a progressão da neurodegeneração, caracterizada pela progressiva e permanente destruição de neurónios em regiões específicas do cérebro. ¹¹⁹

A neurodegeneração refere-se a uma perda progressiva e permanente de neurónios em regiões específicas do cérebro e da medula espinhal. É a condição patológica que caracteriza muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, a DP, esclerose múltipla e doença de Huntington. ¹³²

Os neurónios são células diferenciadas com uma estrutura que lhes permite captar, conduzir e transmitir a informação de um modo coerente, e assim processar estímulos provenientes do interior e do exterior para coordenar o funcionamento do organismo como um todo. ¹³³

Os principais eventos celulares e moleculares que desencadeiam a neurodegeneração são o stress oxidativo, a deposição anormal de proteínas, como a beta-amiloide, a alfa sinucleína, entre outras, a função mitocondrial danificada, a indução de apoptose, o comprometimento da proteostase, a neuroinflamação e alterações nos níveis de neurotransmissores nas fendas sinápticas. ¹³⁴

Ser mentalmente saudável e ativo durante o envelhecimento é uma das maiores preocupações do século XXI, o que impulsionou a procura urgente por novos compostos neuro protetores. ¹³⁵ O envelhecimento é um processo inerente aos organismos multicelulares, caracterizado por uma redução progressiva da capacidade funcional dos vários tecidos e órgãos e pelo aumento da vulnerabilidade a agentes de stress. ¹³⁶

Vários extratos e compostos de algas marinhas, devido à sua constituição ser rica em compostos fenólicos, carotenoides, ácidos gordos e vitaminas insolúveis, têm-se destacado no combate a doenças neurodegenerativas, como a DA e a DP. ^{137,138}

Assim, o estudo das algas marinhas como fontes potenciais de compostos bioativos pode abrir caminho para novas estratégias de combate a essas doenças, seja através do desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos ou através do uso direto de algas em alimentos. ¹³⁵ O uso de antioxidantes naturais na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica é uma alternativa promissora devido ao seu baixo custo e ao seu potencial efeito benéfico para a saúde. ¹³⁹

No entanto, a produção e venda de alimentos funcionais requerem especificações legais, relacionadas com a utilização de novos ingredientes, não menosprezando os aspetos de rotulagem relativos a alegações nutricionais e de saúde. ¹²

De acordo com o Regulamento (CE) nº258/97 do Parlamento Europeu de 27 de Fevereiro de 1997, sobre novos alimentos e ingredientes alimentares, o processo a nível comunitário deverá conter informação científica a vários níveis, incluindo as especificações, efeitos do processamento e modificação do alimento versus estabilidade, o uso, história e características do produto, a avaliação nutricional, composição e impacto na alimentação, a eficácia comprovada a vários níveis (populações diferentes e patologias diversas), a avaliação toxicológica versus informação microbiológica e possíveis efeitos alergénicos ou efeitos secundários no organismo humano.¹²

As tecnologias e os processos utilizados pela indústria alimentar para a incorporação de compostos bioativos em alimentos não têm sido eficazes, apresentando muitas vezes problemas relacionados com solubilidade, degradação, agregação, coalescência e interação com as matrizes alimentares, diminuindo o seu efeito funcional, muitas vezes antes de chegar ao consumidor. A nanotecnologia tem sido apresentada nos últimos anos como uma das formas de solucionar alguns desses problemas.¹⁴⁰ No entanto, o desenvolvimento de nano estruturas enfrenta muitos desafios, desde a escolha do melhor método para obtê-las até identificar o tipo de nano material ideal para um composto bioativo de interesse.¹⁴¹

A nanotecnologia é usada desde 1959, quando o físico Richard Feynman reconheceu o potencial de manipular átomos e moléculas individuais na escala de nanómetros e propôs que os materiais nesta escala possuíssem propriedades físicas únicas.¹⁴² A nanotecnologia é geralmente definida como o projeto, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas onde o controlo do tamanho e forma do material está na escala de 10^{-9} m.¹⁴³

Esta tecnologia transformou muitas áreas da ciência dos alimentos, especialmente aquelas que envolvem processamento, embalagem, armazenamento, transporte, funcionalidade e outros aspetos da segurança alimentar.¹⁴⁴

Neste sentido, a nanotecnologia começa a ser abordada para questões relevantes para a alimentação e nutrição, impulsionadas pela necessidade de sistemas comestíveis capazes de encapsular, proteger e libertar compostos funcionais.^{145,146}

A ação neuroprotetora de um composto bioativo depende da concentração efetiva deste, no seu local de ação, durante um período desejável. Assim, a sua disponibilidade assume um papel crítico na eficácia neuroprotetora. Os sistemas de libertação controlada a esta escala, representam uma área relativamente nova e tem como objetivos prolongar e controlar a administração de forma direcionada.¹⁴⁷

Neste contexto, uma das principais aplicações da nanotecnologia na indústria alimentar passa por desenvolver sistemas de libertação de compostos bioativos à nano-escala, que devido

ao seu tamanho nanométrico podem melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e aspetos sensoriais desses compostos, assim como permitir que estes sejam libertados de uma forma controlada.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

Alguns dos materiais utilizados para alcançar esse objetivo são polissacarídeos, proteínas e lípidos, encontrados em muitos alimentos e que devido à sua biodegradabilidade e não toxicidade, podem ser utilizados para construir sistemas à nano-escala.¹⁵¹

Desta forma, a encapsulação de compostos bioativos ou ingredientes que promovem a saúde, tais como vitaminas, compostos bioativos e antioxidantes em nanossistemas e a sua posterior incorporação em sistemas alimentares é uma forma simples de desenvolver alimentos funcionais. Contudo, a eficácia dos ingredientes funcionais dependerá da preservação da sua biodisponibilidade, consequentemente os potenciais benefícios para a saúde humana dos compostos bioativos podem ser comprometidos pelo insuficiente tempo de residência no trato gastrointestinal, pela sua baixa permeabilidade ou solubilidade, assim como pela sua instabilidade quando submetidos às condições encontradas durante o processamento alimentar ou no trato gastrointestinal.¹⁵² A nanoencapsulação é uma alternativa viável para preservar e proteger estes compostos contra circunstâncias ambientais inadequadas e aumentar a sua biodisponibilidade e estabilidade, favorecendo assim a sua aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos.¹⁵³ O encapsulamento diminui a volatilidade, aumenta a estabilidade química e térmica protegendo contra a oxidação, a luz, o pH, a humidade e a digestão gástrica, tendo também a capacidade de disfarçar o sabor e aroma desagradáveis, promover a libertação controlada, melhorar a solubilidade de compostos lipofílicos em meios aquosos, e permitir a absorção prolongada de nutrientes.¹⁵⁴

A nanotecnologia emprega materiais que interagem com sistemas biológicos a nível molecular e podem revolucionar o tratamento de doenças neurodegenerativas estimulando, respondendo e interagindo com locais-alvo para induzir respostas fisiológicas, minimizando os efeitos colaterais, tornando-se uma ferramenta promissora para o diagnóstico e terapia de doenças neurodegenerativas.¹⁴²

Na indústria farmacêutica, os primeiros estudos começaram na década de 50 do século XX com o propósito de libertar os compostos necessários apenas nos órgãos que deveriam realmente receber o composto.¹⁵⁵

Em 2019 já eram conhecidos 633 nanomateriais disponíveis sendo 55 associados à agricultura e alimentos. Além disso, as estimativas já previam um aumento exponencial dos produtos alimentares associados à nanotecnologia. As aplicações mais estudadas para nanoestruturas de alimentos são a produção de ingredientes nanométricos ou aditivos para

alterar o ingrediente, a funcionalidade, geralmente associada à melhoria da qualidade, fortificação, encapsulamento de probióticos, formação de estruturas ou texturas alimentares, e sistemas de embalagens inteligentes que detetam e neutralizam a deterioração química.¹⁵⁶

Existem diferentes nanoestruturas e uma variedade de materiais para a sua construção, dentre estas, as os lipossomas são os mais estudados. Produzidos por métodos convencionais de alta energia ou novos de baixa energia. Além dos lipossomas, existe, ainda os sistemas fitossômicos, mais versáteis em termos de moléculas que podem ser encapsuladas e produtos alimentares aos quais podem ser adicionados.¹⁵⁶

2.4.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas, com diâmetro entre 20 nm e centenas de micrómetros, compostas por uma ou múltiplas bicamadas concêntricas de fosfolípidos, separadas por fases aquosas englobando internamente um compartimento aquoso.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Gregory Gregoriadis foi o primeiro a definir o conceito de lipossomas, estabelecendo que estes sistemas lipídicos poderiam encapsular fármacos e serem usados como sistemas de distribuição dos mesmos. Durante os anos 70 e 80, foram feitos vários progressos no campo da composição e consequente estabilidade dos lipossomas, permitindo o aumento do seu tempo de circulação sanguínea.¹⁴²

Os lipossomas podem ser produzidos com várias classes de fosfolípidos encontradas nas membranas biológicas, nomeadamente fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélinea.¹⁶⁰

Atualmente a tecnologia de lipossomas tem sido aplicada à maioria dos produtos alimentares funcionais. Para além das aplicações convencionais como transportador de conservantes e corantes naturais, esta tecnologia tem sido usada na fortificação de alimentos, a fim de acrescentar constituintes nutricionais, em especial na libertação controlada e estabilidade aprimorada de compostos bioativos.¹⁵⁵

Lipossomas ativos contêm substâncias que providenciam uma libertação seletiva e controlada, que pode ser ativada de dois modos. A ativação por afinidade, associada a compostos que interagem por afinidade, como por exemplo antigénios, anticorpos ou enzimas, em que depois da interação com o alvo, a substância encapsulada é libertada. Por outro lado, temos um mecanismo de libertação que envolve a incorporação de um composto que promove alterações estruturais no lipossoma e, consequentemente, a libertação do fármaco, como resposta a determinados estímulos externos, como alterações do pH, concentrações de iões, temperatura ou irradiação de luz.¹⁶¹

O lipossoma tem a capacidade de incorporar substâncias lipofílicas e hidrossolúveis. Esta propriedade deve-se ao facto de a sua estrutura ter uma porção hidrofílica que retém água.¹⁶² Devido às suas características hidrofílicas (cabeça polar dos fosfolípidos) e hidrofóbicas (cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos), a dispersão destes fosfolípidos em água promove a sua auto-organização em estruturas supramoleculares, como os lipossomas. Os lipossomas apresentam uma bicamada lipídica nanoestruturada (Figura 2.2), formada por duas monocamadas de fosfolípidos com orientação justaposta, que devido ao efeito hidrofóbico forma vesículas fechadas com um compartimento interno aquoso.¹⁶³ Devido às suas características hidrofílicas (cabeça polar) e hidrofóbicas (cadeias hidrocarbonadas), a dispersão destes fosfolípidos em água promove a sua auto-organização em estruturas supramoleculares, como os lipossomas. Os lipossomas apresentam uma bicamada lipídica nanoestruturada (Figura 2.2), formada por duas monocamadas de fosfolípidos com orientação justaposta, que devido ao efeito hidrofóbico forma vesículas fechadas com um compartimento interno aquoso.¹⁶³

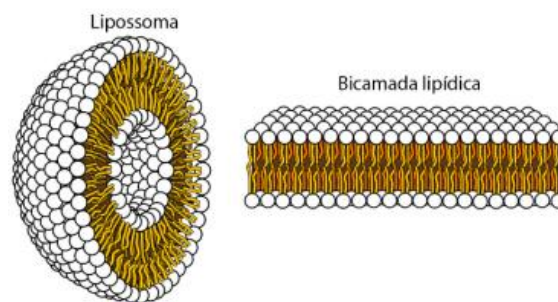


Figura 2. 2 - Representação de um lipossoma e respetiva bicamada lipídica¹⁶⁴

Além disso, reduzem a toxicidade e aumentam a estabilidade dos fármacos encapsulados.

158

A desvantagem da sua formulação está relacionada com a sua estabilidade, ficando comprometida devido à formação de cristais de gelo, oxidação e hidrólise dos fosfolípidos bem como a instabilidade das bicamadas após a libertação do material retido, condicionando o seu tempo de vida. Além disso, os lipossomas apresentam baixa solubilidade em água e alto custo de produção.¹⁵⁸

2.4.2 Fitossomas

Muitos constituintes ativos extraídos de plantas são pouco absorvidos quando administrados por via oral, o que a limita sua ampla aplicação.¹⁶⁵ A má absorção destes compostos resulta de duas propriedades. Primeiro, as estruturas multi-anéis dos polifenóis são muito grandes para serem absorvidas por difusão passiva ou absorção não ativa. Em segundo

lugar, a baixa solubilidade em água impede-os de atravessarem a membrana externa das células gastrointestinais. ¹⁶⁵

Foram desenvolvidos fitossomas pela incorporação de extratos de plantas ou fitoconstituintes solúveis em água em fosfolípidos, como a fosfatidilcolina, com estrutura representada na Figura 2.3, de forma a constituírem complexos moleculares. A fosfatidilcolina apresenta na sua estrutura uma cabeça solúvel em água e duas caudas solúveis em lípidos. Caracterizados pela sua dupla solubilidade, os fosfolípidos atuam como um emulsionante eficaz. ¹⁶⁶

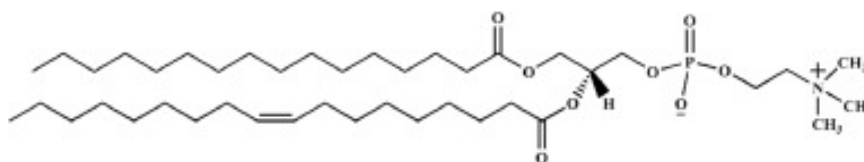


Figura 2.3 - Estrutura da Fosfatidilcolina¹⁶⁵

Esta complexação aumenta a biodisponibilidade e pode reduzir a dose necessária das substâncias ativas quando administradas por via oral, pela absorção mais rápida e melhorada no trato intestinal. ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

Extratos contendo flavonoides são insolúveis em clorofórmio, éter etílico ou benzeno. No entanto, tornam-se extremamente solúveis nesses solventes após a formação de fitossomas. Esta mudança de propriedades químicas e físicas é devido à formação de um verdadeiro complexo estável. ¹⁶⁶

Foi demonstrado que a principal interação fosfolípido e substrato se deve à formação de ligações de hidrogénio entre a cabeça polar dos fosfolípidos e os grupos funcionais polares do substrato. ¹⁶⁶

Qualquer tipo de composto que possua um átomo de hidrogénio ativo gerará um agente anfifílico, um composto químico que possui, na sua composição, uma parte hidrofílica, solúvel em água e outra hidrofóbica, não solúvel em água, mas que interage com outros compostos ou substâncias, facilitando a passagem da barreira da membrana celular. Tornam-se num material de interesse para a produção de nanopartículas, aumentando a absorção através de barreiras biológicas ricas em lípidos e a eficácia do extrato com efeitos terapêuticos subsequentes aprimorados. ¹⁶⁸

A diferença entre um lipossoma e um fitossoma, ilustrada na Figura 2.4, é que nos lipossomas não existe nenhuma ligação química formada entre os fosfolípidos e as substâncias que incorporam, ao contrário do que acontece com o fitossoma. ¹⁶⁹

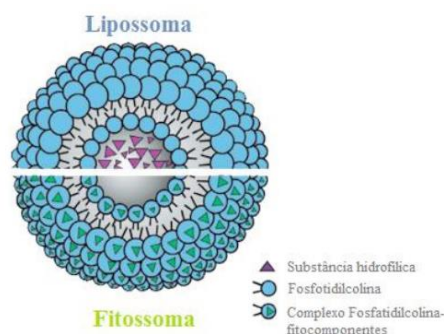


Figura 2. 4 – Diferença estrutural entre fitossoma e lipossoma ¹⁷⁰

Não se formando qualquer ligação química no caso dos lipossomas, as moléculas de fosfatidilcolina circundam a substância solúvel em água podendo haver centenas ou mesmo milhares de moléculas de fosfatidilcolina em torno do composto solúvel em água. Em contraste, no fitossoma, a fosfatidilcolina e os componentes da planta formam um complexo molecular 1:1 ou 2:1, considerando-se que, uma razão estequiométrica de 1:1 será a razão mais eficiente para a preparação de complexos de fosfolípidos. Esta diferença permite ao fitossoma uma melhor biodisponibilidade e muito melhor absorção do que os lipossomas. ^{165,166}

Além disso, a fosfatidilcolina não atua apenas como ingrediente adicionado à formulação de complexos fitofosfolipídicos, mas também atua como hepatoprotetor. Assim, quando a fosfatidilcolina é tomada pelo paciente, ela mostrará o efeito sinérgico para proteger o fígado. Em algumas situações, os fosfolípidos também têm benefícios nutricionais. ¹⁶⁵

Os fatores que influenciam a formação de complexos de fitofosfolípidicos são principalmente os solventes utilizados, a razão estequiométrica de constituintes ativos, a temperatura de reação e o tempo de reação ¹⁶² A reação de formação do complexo é realizada isoladamente ou na mistura natural em solvente aprótico, tal como dioxano, etanol ou acetona, a partir do qual o novo complexo pode ser isolado por precipitação com um não solvente, geralmente um hidrocarboneto alifático, por liofilização ou secagem por pulverização. ¹⁷¹ Quando o rendimento de formação dos complexos fosfolipídicos é suficientemente alto, o etanol é um solvente bastante útil e popular que deixa menos resíduos e causa danos mínimos.

¹⁶⁵

2.5 Avaliação do tempo de prateleira, análise sensorial e nutricional de alimentos que integram compostos bioativos

2.5.1 Tempo de prateleira

De acordo com o *Institute of Food Science and Technology* o tempo de prateleira é o período de tempo no qual o produto alimentar permanece seguro, mantém as características

sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e que está de acordo com a sua declaração nutricional, quando é armazenado nas condições recomendadas.¹⁷²

Segundo a legislação Europeia (diretiva 2000/13/CE), o tempo de prateleira tem que ser indicado no rótulo do produto alimentar como: “Consumir de preferência antes de”: indica a data de durabilidade mínima, ou seja, a data até à qual o produto conserva as suas propriedades nas condições de conservação adequadas, ou “Consumir até” no caso de géneros alimentares microbiologicamente muito perecíveis e que rapidamente podem constituir um perigo imediato à saúde humana indica-se a data limite de consumo.

A vida útil de um produto alimentar é geralmente definida como o período em que ele pode ser armazenado sem se tornar inadequado para o consumo. Além da segurança alimentar não deverá apresentar defeitos físicos ou organoléticos e deverá manter uma certa qualidade nutricional.¹⁰⁰

Durante o processamento de alimentos, são empregues diferentes tecnologias para produzir alimentos com distintas características sensoriais, nutricionais e físico-químicas. Com o intuito de garantir a qualidade microbiológica desses produtos, são tradicionalmente aplicados tratamentos térmicos para aumentar o tempo de vida de prateleira e conservar os alimentos.¹⁵⁵ Os tratamentos térmicos, por exemplo, esterilização tradicional ou pasteurização, são amplamente utilizados, aumentando a vida útil de alimentos por inativação de enzimas e microrganismos. No entanto, esses processos estão associados a algumas desvantagens, incluindo perdas de nutrientes e ingredientes bioativos, bem como mudanças físicas indesejáveis.¹⁵⁵ Os tratamentos térmicos, por exemplo, esterilização tradicional ou pasteurização são amplamente utilizados, aumentando a vida útil de alimentos por inativação de enzimas e microrganismos. No entanto esses processos estão associados a algumas desvantagens, incluindo perdas de nutrientes e ingredientes bioativos, bem como mudanças físicas indesejáveis¹⁵⁵

Também conhecida como "Shelf Life", a análise de tempo de prateleira visa verificar o tempo que uma substância leva para sofrer algum tipo de transformação, podendo perder a sua capacidade sensorial, físico-química e até microbiológica. Alguns parâmetros considerados no momento das determinações da integridade e validade de um alimento, incluem: o crescimento de bactérias, a perda de nutrientes, a alterações no sabor, a perda ou ganho de humidade, entre outros. Estes parâmetros são de extrema importância, e devem ser escolhidos de acordo com o tipo de alimento analisado, garantindo uma análise completa e com alto grau de confiabilidade.¹⁷³

Um ponto importante sobre a análise de tempo de prateleira é a necessidade de um tempo relativamente grande para a sua realização. Como os resultados dessa análise afetam diretamente o consumidor, podem ser necessários meses para que um diagnóstico completo seja finalizado. ¹⁷³

2.5.2 Análise sensorial

A nanoencapsulação pode ser usada para evitar a alteração dos atributos sensoriais que ocorrem em alimentos enriquecidos com ingredientes de origem marinha. No entanto, a análise sensorial não deixa de ser uma parte essencial no desenvolvimento de produtos alimentares que atendam às expectativas dos consumidores. ¹⁷⁴

Este tipo de teste é frequentemente empregue para alimentos funcionais e bebidas que contenham compostos bioativos derivados de ambiente marinho, devido a estes poderem afetar negativamente atributos sensoriais, como aroma, sabor e textura. ¹⁷⁴ Definida como a disciplina da Ciência usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos e materiais tal como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição, a análise sensorial tem-se demonstrado como uma de ferramenta-chave para as indústrias alimentares para alcançar a performance de excelência exigida pelo mercado. Evoluiu como disciplina da ciência a passos largos nas últimas décadas como instrumento valioso não só na qualidade do produto, mas também no seu processo de desenvolvimento e definição de aceitabilidade, pela investigação minuciosa das preferências e das percepções do consumidor em relação ao produto, através da análise dos sentidos. ¹⁷⁵

Esta análise poderá ser desenvolvida por três métodos, o discriminativo, que pretende identificar as diferenças qualitativas e/ou quantitativas que há entre as amostras, o descritivo, onde se descrevem de maneira qualitativa e/ou quantitativamente as amostras, incluindo odor, textura, aparência e sabor, ou o método afetivo, onde se expressa essencialmente a opinião pessoal. ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Todos os métodos têm por objetivo analisar os atributos sensoriais do produto, respetivamente, a cor, onde é considerado o tom, a intensidade e o brilho. Quando qualquer uma destas propriedades é alterada, seja por fatores internos ou externos, a qualidade dos alimentos pode ser afetada. Por isso, é necessário verificar e relacionar estes fatores aos resultados esperados ^{179,180} Todos os métodos têm por objetivo analisar os atributos sensoriais do produto, por exemplo, a cor, o aroma, o sabor, a textura, etc. Quando qualquer uma destas propriedades é alterada, seja por fatores internos ou externos, a qualidade dos alimentos pode ser afetada. Por isso, é necessário verificar e relacionar estes fatores aos resultados esperados. ^{179,180} No que respeita à cor, é considerado o tom, a intensidade e o brilho. Devido a existirem

substâncias no alimento que volatilizam e são captadas pelo olfato, o aroma torna-se num dos parâmetros que compõe o sabor do alimento. Quando o alimento é colocado na boca percebendo-se nesta etapa o aroma pelo olfato e o sabor pela identificação de características primárias (doce, amargo, ácido, salgado etc.)¹⁸¹ Devido a existirem substâncias no alimento que volatilizam e são captadas pelo olfato, o aroma torna-se num dos parâmetros que compõe o sabor do alimento. Quando o alimento é colocado na boca percebe-se nesta etapa o aroma (pelo olfato) e o sabor (pela identificação de características primárias como doce, amargo, ácido, salgado etc.).¹⁸¹ Percebida assim que mastigamos, cortamos ou pressionamos o alimento, a textura permite avaliar a maciez, elasticidade, crocância, entre outras características.¹⁸² Percebida assim que mastigamos, cortamos ou pressionamos o alimento, a textura permite avaliar a maciez, elasticidade, crocância, entre outras características.¹⁸²

As circunstâncias de armazenamento, especialmente concentração de oxigênio e temperatura, apresentam-se como os fatores mais significativos que afetam o crescimento microbiano e as reações químicas nos produtos alimentares.¹⁸³ No entanto, as alterações organolépticas e perda de estabilidade física causada por processos físico-químicos ou atividade enzimática residual são o principal fator limitante para os produtos.¹⁰⁰

O efeito da integração de extratos de algas marinhas ou algas marinhas em alimentos funcionais ainda cria algumas dificuldades e desafios na sua comercialização devido ao seu impacto sensorial sobre os alimentos e há pouca consciencialização dos consumidores sobre os seus benefícios para a saúde.¹⁰⁰

Nos subcapítulos seguintes, detalhar-se-ão os vários tipos de deterioração que podem ocorrer durante o armazenamento dos alimentos. O tipo de deterioração mais perigoso é o microbiológico, em que o alimento se torna um problema de segurança alimentar podendo causar doença ou morte. No entanto, outros tipos de deterioração poderão ocorrer, ao nível da cor, do sabor, do aroma e da textura. Por último, poderá haver deterioração ao nível nutricional, havendo perdas de nutrientes, como por exemplo de vitaminas. Podem referir-se 3 grandes tipos de deterioração alimentar: física, química e microbiológica, estando relacionadas, ou seja, um tipo de deterioração pode levar ao aparecimento de outro.¹⁸⁴

2.5.3 Deterioração química

2.5.3.1 Oxidação lipídica

Os lípidos são os macro constituintes menos estáveis nos alimentos, principais constituintes das carnes e frutos do mar. A oxidação lipídica ocorre quando as ligações duplas

de um ácido gordo são atacadas por oxigénio, hidrogénio e enzimas. Este tipo de oxidação causa alteração do cheiro e sabor dos alimentos, além da perda de vitaminas, degradação das proteínas e produção de substâncias tóxicas. ¹⁸⁵

Os produtos primários da oxidação lipídica são os hidroperóxidos, que são compostos instáveis e tendem a quebrar formando produtos de oxidação secundária, incluindo aldeídos, cetonas e álcoois, que são os produtos voláteis que causam sabor estranho nos produtos. ¹⁸⁶

A temperatura, o oxigénio e a presença de água são os fatores mais críticos que influenciam a taxa de oxidação, aumentando exponencialmente com o aumento da temperatura.

^{184,187}

2.5.3.2 Degradação enzimática

Geralmente gera um produto mole ao ponto de ser inaceitável para os consumidores. As reações envolvem a degradação enzimática das pectinas, nas quais a pectina é primeiramente parcialmente degradada, e posteriormente despolimerizada originando a perda de firmeza. ¹⁸⁸

Certas reações catalisadas por enzimas podem ocorrer em frutas e vegetais, causando degradações na cor e na textura. Bananas maduras descascadas ou maçãs, peras ou alguns vegetais fatiados podem desenvolver uma descoloração castanha desagradável quando expostos ao ar. Essas reações são catalisadas pelas polifenol oxidases, enzimas que reagem com compostos fenólicos e com o oxigénio para formar pigmentos. Essas reações ocorrem rapidamente quando as células são fraturadas por hematomas ou cortes. ¹⁸⁵

2.5.3.3 Escurecimento não enzimático

Outras reações de deterioração química são as reações de Maillard, ou mais comumente conhecidas por acastanhamento não enzimático, as quais ocorrem entre os grupos amino das proteínas e açúcares redutores. Estas reações estão associadas à perda do valor nutricional do alimento. O esquema de reação envolve reações para formar uma base de Schiff instável e depois a transformação através do rearranjo de Amadori. As reações continuam através da degradação de Strecker e reações de polimerização para formar voláteis e pigmentos escuros. Essa reação leva ao desenvolvimento de uma cor acastanhada e sabor que acompanha os alimentos, o que é altamente desejável no cozimento de pão e fabrico de cerveja, mas indesejável em alimentos quando armazenados. Ocorre principalmente em alimentos desidratados e semi húmidos, como frutas e vegetais secos, ovos e leite em pó, concentrados de sumos de frutas, alguns vegetais enlatados e produtos à base de carne. Além do escurecimento

da cor, a reação de Maillard também leva à perda de solubilidade da proteína, sabor amargo, alterações de textura e até mesmo a produção de substâncias tóxicas. ¹⁸⁹

Entre os fatores que afetam as reações de escurecimento durante o armazenamento estão as estruturas de aminoácidos e açúcares envolvidos, temperatura, teor de humidade, atividade de água (aw) e valor de pH. ¹⁸⁴

A taxa de escurecimento aumenta à medida que a aw aumenta e atinge um máximo entre 0,6 e 0,8. A reação de escurecimento de Maillard é fortemente afetada pelo pH ocorrendo a valores de pH alto sendo ainda catalisada por iões metálicos como cobre e ferro. ¹⁸⁴

2.5.3.4 Foto-oxidação

Leite, chocolate, manteiga e outros alimentos, quando expostos à luz, como luz solar ou luz fluorescente, podem desenvolver um sabor característico causado pela foto-oxidação. Poderá ocorrer devido à oxidação fotolítica de radicais livres ou oxidação lipídica fotossensibilizada. Ambas as vias de reação podem levar à formação de radicais livres iniciando assim processos oxidativos autocatalíticos. Em particular, produtos lácteos, como leite e queijo, são muito sensíveis à oxidação. ¹⁹⁰

O processo oxidativo induzido pela luz é também uma das principais causas de deterioração em bebidas alcoólicas, como vinhos, degradando o sabor e a cor. ¹⁹¹

O potencial de foto-oxidação está relacionado com a distribuição espectral e intensidade de uma fonte de luz, seu comprimento de onda, da presença de sensibilizadores, temperatura, tempo de exposição e quantidade de oxigénio disponível. ¹⁸⁵

2.5.3.5 Degradação de proteínas

Durante o armazenamento, a proteína poderá degradar-se de inúmeras maneiras. A atividade enzimática, é um importante fator contribuinte. Uma protéase pode originar hidrólise das ligações peptídicas que unem os aminoácidos na cadeia polipeptídica da proteína, digerindo estas cadeias em fragmentos mais pequenos. No leite, a degradação das proteínas lácteas, leva à coagulação e gelificação. ¹⁸⁵

A oxidação de proteínas é outra maneira pela qual as proteínas são degradadas. Nas carnes, a superexposição ao oxigénio pode fazer com que a mioglobina e a oximioglobina se oxidem em metamioglobina, resultando na mudança da cor da carne de vermelho brilhante para castanha. A oxidação de proteínas é causada por reações com oxigénio geradas via oxidação lipídica, reações oxidativas catalisadas por metais ou enzimas e outros processos químicos e

biológicos. Alterações físicas e químicas nas proteínas oxidadas incluem destruição de aminoácidos, diminuição da solubilidade da proteína devido à sua polimerização, perda da atividade enzimática e aumento da digestibilidade da proteína.¹⁹²

2.5.4 Deterioração Física

Para a instabilidade física, alguns exemplos são: frutas e vegetais “pisados” ou partidos, alimentos quebradiços como as batatas fritas e os cereais, quebra devido à desidratação, etc. Além do problema direto a que deterioração física leva, relacionado com a aparência visual, pode haver consequências a partir desta, por exemplo, a ruptura das células será seguida pela propagação de ruptura da parede celular e quebra de ligações intercelulares, resultando na perda de fluido celular. Estes acontecimentos podem levar à perda de cor, acastanhamento enzimático e a um crescimento microbiano mais rápido.^{185,193,194}

O teor de humidade e a_w são outros dois fatores críticos que influenciam a estabilidade e a vida útil dos alimentos. A a_w descreve o grau em que a água está livre ou ligada a outros componentes, dependendo da composição, temperatura e estado físico dos compostos. Para um teor de água fixo, quanto mais fracas as interações de água, maior a a_w , e mais instável será o produto.¹⁹⁵

A humidade relativa do ambiente afeta diretamente o teor de humidade dos alimentos. A diferença entre a humidade relativa do ambiente circundante e a a_w do alimento determina se um alimento ganha ou perde humidade durante o armazenamento. Quanto maior a diferença entre estes dois valores maior será o potencial de migração da humidade para ou do ambiente. Esta migração ocorre continuamente até que o equilíbrio seja alcançado.¹⁹⁶ A migração de humidade e a mudança na a_w impactam diretamente a vida de prateleira e a qualidade dos alimentos quando os alimentos são consumidos, alterando a sua textura. O exemplo mais reconhecido são os produtos secos como cereais matinais e batatas fritas que perdem sua a sua crocância depois de ganhar humidade.¹⁹⁶

A transferência de humidade pode causar mudanças na temperatura de transição vítrea (T_g), uma propriedade que reflete o nível de mobilidade molecular nos alimentos e afeta significativamente a estabilidade e a vida útil. A T_g infere o material mudando do estado vítreo para o estado de borracha, ou vice-versa, acompanhado de mudanças nas propriedades termodinâmicas, mobilidade molecular, constante dielétrica e propriedades mecânicas.¹⁹⁷

A T_g de um alimento pode ser identificada com um diagrama de estado, um mapa de estabilidade mostrando diferentes estados e fases de um alimento, como ponto de congelamento e transição vítrea em função do teor de sólidos e da temperatura. O diagrama de estado define

o teor de humidade e a região de temperatura na qual um domínio alimentar é vítreo, emborrachado, cristalino ou congelado. Ele ajuda a entender as mudanças complexas na estrutura do alimento quando o seu teor de água ou temperatura é alterada e pode ser usado para identificar a estabilidade do alimento durante o armazenamento, bem como selecionar condições adequadas de temperatura e teor de humidade para o processamento.¹⁹⁸

A vida útil resultante raramente depende de um único fator, mas de uma combinação de fatores que podem ter efeitos antagónicos ou sinérgicos, que precisam de ser considerados para cada tipo de produto e formulação. Isso também implica que estudos de vida útil requerem conhecimentos de múltiplas disciplinas dentro da ciência alimentar.¹⁹⁹

2.5.5 Fatores de deterioração

Como referido anteriormente, existem diversos fatores que afetam deterioração dos alimentos. Estes podem ser intrínsecos, como o pH, a a_w e a presença de nutrientes no alimento, ou podem ser extrínsecos, como a temperatura e a exposição à luz e/ou oxigénio. Todos estes fatores são influenciados pelo processamento, embalagem e as condições de armazenamento.

172

2.5.5.1 Temperatura

A temperatura é dos fatores mais importantes que afeta o tempo de prateleira dos alimentos. O controlo deste fator é dos métodos mais usados para manipular o conteúdo microbiano dos produtos alimentares, quando controlada pode inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogénicos ou então otimizar o crescimento de outros microrganismos com interesse para o produto final.²⁰⁰ Embora os microrganismos se tenham adaptado a crescer em diferentes intervalos de temperatura é possível inferir que as temperaturas de crescimento mais comuns das bactérias são entre 35 °C e 40 °C e de 25 °C a 30 °C para os fungos.²⁰⁰

Além da influência na flora microbiana, aumentar a temperatura normalmente leva ao aumento de reações químicas havendo uma deterioração mais rápida.¹⁸⁵

2.5.5.2 Atividade da água (a_w)

Este parâmetro é indicador do potencial que certo produto tem para interações químicas e é bastante utilizado como indicador de estabilidade de alimentos porque se relaciona com o crescimento microbiano (microrganismos necessitam de água disponível para crescer) e com a

taxa de reações químicas. Deste modo, pode-se utilizar a a_w para se prever a estabilidade de um alimento durante determinado período de tempo sob certas condições de armazenamento. Os valores de a_w variam de 0 a 1, sendo 1 o valor para água pura.²⁰⁰

Na Figura 2.5 é possível observar que a baixa atividade de água retarda o crescimento microbiano, decresce as reações enzimáticas e as reações de Maillard. Por outro lado, baixa a_w aumenta as reações de oxidação lipídica.²⁰¹

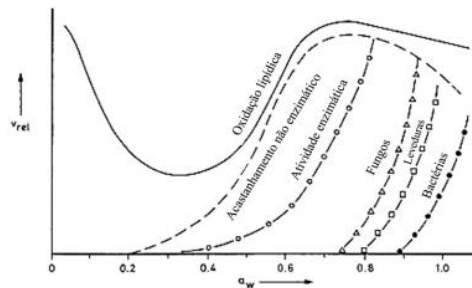


Figura 2.5 - Deterioração em função da atividade da água²⁰¹

2.5.5.3 pH

Verifica-se que o pH tem muita influência nos microrganismos, nomeadamente no seu crescimento, sobrevivência, esporulação e germinação. Deste modo, o pH afeta a conservação dos alimentos e a sua segurança microbiológica. Cada microrganismo tem uma gama de pH na qual consegue crescer, por exemplo, as bactérias crescem entre 4,0 e 9,0. As leveduras e os bolores têm gamas de crescimento maiores, nomeadamente entre 2,5 e 8,5 e entre 1,5 e 9,5 respetivamente.²⁰⁰

Além de ter efeito a nível microbiológico, o pH tem também influência nas reações químicas. Relativamente à reação de Maillard, valores de pH altos normalmente promovem esta reação.¹⁸⁵

Além disso, o pH tem grande influência na solubilidade e funcionalidade das proteínas e, por isso, a atividade enzimática pode ser bastante afetada, sendo que valores extremos de pH podem levar à sua perda de atividade. Deste modo o acastanhamento enzimático poderá ser afetado.¹⁸⁵

2.5.5.4 Oxigénio e Luz

Tanto a luz como o oxigénio, como anteriormente referido, podem levar à deterioração dos alimentos. Ambos têm a capacidade de provocar e acelerar o processo de oxidação lipídica. Além disso, o oxigénio tem influência ao nível microbiano, pois permite o crescimento de

bactérias aeróbias e de fungos e a sua ausência permite o crescimento de bactérias anaeróbias.

185

2.5.6 Métodos de estudo do tempo de prateleira

Não há falta de métodos para medir as alterações nos produtos que, se indesejáveis, para um determinado contexto, seriam chamadas de degradação. Assim, medir o desenvolvimento de sabor positivo é equivalente a medir a degradação do alimento em questão.²⁰²

O método mais utilizado é o método direto, o qual implica o armazenamento do produto em estudo, nas condições desejadas, durante determinado período de tempo sendo regularmente analisado para se observar o momento em que começa a deterioração. Há vários passos a ter em conta para implementar este método, começando pela identificação do que poderá causar a deterioração do alimento, escolher quais os testes a utilizar, tendo em conta os fatores que afetarão o produto. Habitualmente, devem escolher-se os testes sensoriais, microbiológicos, químicos e físicos, planear o estudo de tempo de prateleira, definir quanto tempo será o estudo, com que regularidade serão efetuados os testes, quantas amostras serão testadas, efetuar o estudo do tempo de prateleira, durante o qual as amostras deverão estar todas sob as condições a que estariam normalmente sujeitas e essas condições deverão ser monitorizadas, e por fim determinar o tempo de prateleira para qual o produto se mantém seguro e é aceite pelo consumidor.²⁰³

Tendo em conta todos estes tópicos verifica-se que um estudo de tempo prateleira é único para cada produto. Idealmente, este tipo de estudo deveria ser feito nas condições de armazenamento: ótimas, as que são mais desejáveis para o produto e as condições que levem a um maior tempo de prateleira; nas condições normais, as que são mais prováveis de acontecer; e nas condições mais severas para o produto.¹⁸⁴

Os métodos indiretos poderão ser executados através de testes acelerados, em que o tempo de estudo é reduzido pelo aumento deliberado da deterioração. O princípio do estudo está em, por exemplo, aumentar a temperatura de armazenamento, o que irá proporcionar um aumento da taxa de certa reação limitante e assim o tempo de vida é atingido muito mais rapidamente. Os valores obtidos são depois extrapolados para a temperatura normal de armazenamento. Estes estudos são bastante atrativos para a indústria alimentar pois perante a pressão competitiva e comercial a que o mercado obriga o facto de se ter resultados mais rápidos é bastante vantajoso. No entanto, estes estudos só podem ser aplicados caso haja uma relação entre o comportamento do produto à temperatura normal e o seu comportamento sob condições aceleradas. Para isso é necessário que o processo de deterioração do alimento siga um modelo cinético válido.¹⁸⁴

Diversos estudos demonstraram que a incorporação de algas marinhas, como a *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell, *Cystoseira nodicaulis* (Withering) M.Roberts, *Sargassum siliquastrum* (Mertens ex. Turner) C.Agardh, *Padina antillarum* (Kützinger) Piccone, *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J.Agardh e *Kappaphycus alvarezzi* (Doty) Doty ex Silva e/ou isolados de algas marinhas nos sistemas alimentares pode melhorar as propriedades de validade, nutricional, textural, organoléptica, sensorial e sanitária dos produtos finais. No entanto, os efeitos diferem de acordo com as espécies de algas marinhas e a quantidade utilizada na formulação.¹⁰⁰

2.6. Objetivos da dissertação

Esta tese teve como objetivo principal desenvolver um produto funcional com atividade neuroprotetora, que fosse adequado para a população sénior. Desta forma, pensou-se num alimento de fácil deglutição e rico em água, como os iogurtes, e incorporou-se uma fração de um extrato de *Codium tomentosum* obtido por extração subcrítica com água. Esta fração demonstrou ter atividade neuroprotetora em vários ensaios in vitro. Assim, os vários objetivos secundários da tese foram:

1 – Desenvolver e caracterizar fitossomas contendo a fração do extrato de *Codium tomentosum*.

2 – Desenvolver iogurtes contendo diferentes percentagens de fração de *Codium tomentosum* ou de fitossomas.

3 – Caracterizar os iogurtes através de vários parâmetros físico-químicos bem como avaliar a atividade de inibição das enzimas cerebrais (AChE e BuChE).

4 – Efetuar estudos preliminares de análise sensorial dos iogurtes desenvolvidos.

3. Secção Experimental

3.1 Materiais e reagentes

Extrato de *Codium tomentosum* (alga verde) obtido a partir de extração subcrítica com água ¹³⁵, L- α -fosfatidilcolina (gema de ovo, Tipo XI-E, 100 mg/mL em clorofórmio, $\geq 99\%$, solution) da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), etanol absoluto anidro, da Carlo Erba Reagents (Chau. du Vexin, Val-de-Reuil, França), clorofórmio ACS BASIC CL0217, estabilizado com etanol da Scharlab (Barcelona, Espanha), 1-octanol ACS reagente, adequado para UV/Vis spectroscopy, $\geq 99,5\%$ (GC) da Sigma Chemicals Co, KBr – Brometo de potássio (IR) PAI da Panreac (Darmstadt, Alemanha), ApoE3 humana (recombinante, expresso em E. coli, $\geq 90\%$ (SDS-PAGE), (HPLC) da Sigma Chemicals Co., DSPE-PEG (2000) amina (clorofórmio 1,2 - distearoyl-sn-glycero - 3 - fosfoetanolamina - N - [amino (polietilenoglicol) - 2000]), da Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EUA), iodeto de acetiltiocolina $\geq 98\%$ (TLC), iodeto de butiriltiocolina $\geq 98\%$, ácido 2-nitrobenzóico (5,5'-Dithiobis, reagente de Ellmans, DTNB), da Pierce™ da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA), amido solúvel GR ISO. CAS 9005-84-9, pH 6.0 - 7.5, tiosulfato de sódio penta hidratado 99.5% para análise, ambos da Merck (Darmstad, Alemanha), iodeto de potássio RPE-ACS, hidróxido de sódio AGR, micropérolas de baixo teor em metais, da Labbox (Barcelona, Espanha), hidrogenoftalato de potássio, $\geq 99.5\%$, da Honeywell (Charlotte, Carolina do Norte, EUA), ácido sulfúrico a 96%, RPE (Para análise – ISSO), 2.5 l, da Carlo Erba reagentes, pastilhas para Kjeldahl (Catalisador com 0.3 % CuSO₄.5H₂O) da Panreac, padrão primário e solução tampão Trizma®, $\geq 99.9\%$ (titulação), cristalino, albumina sérica bovina, fração de etanol frio, pH 5,2, $\geq 96\%$ ambos da Sigma Chemicals Co.

3.2 Resultados de estudos prévios

3.2.1 Preparação dos extratos aquosos de *Codium tomentosum*

A macroalga *Codium tomentosum* foi produzida em sistema integrado de aquicultura multitrófico sendo fornecida pela ALGAplus, localizada em Ílhavo, Portugal. Segundo um estudo prévio realizado no GRAQ ¹²⁴ as amostras foram hidratadas por 5 min em água salgada (35 g NaCl/L) e depois lavadas em água ultrapura para eliminar o NaCl. Em seguida, foram desidratadas a 41°C durante 18 horas, moídas e peneiradas para obtenção de partículas na faixa de 1–2 mm. Resumidamente, a extração por água subcrítica da alga foi efetuada iniciando se pela injeção de água destilada por bomba de líquido de alta pressão num reator de leito fixo de

aço inoxidável (51 cm de comprimento, 2,6 cm de diâmetro interno) colocado dentro de um forno elétrico com controlo de temperatura.

O fluxo de água foi aquecido antes de entrar, a temperatura da água no reator foi monitorizada continuamente por um termopar e a pressão do sistema controlada por um regulador de contrapressão.

O reator foi preenchido com aproximadamente 20 g da alga marinha, colocada entre discos porosos. A pressão foi mantida constante em 100 bar e o fluxo de água constante de 10 mL/min. Foi utilizado um gradiente de temperatura para se obter 4 frações diferentes a partir da mesma matriz de alga: F1 (temperatura ambiente – 90 °C); F2 (90-140 °C); F3 (140-190 °C); F4 (190-250 °C). As frações foram liofilizadas e posteriormente armazenadas à temperatura ambiente. Para este trabalho, utilizou-se apenas a F4, que se demonstrou, segundo o mesmo estudo, rico em compostos fenólicos (Figura 3.1 [A]), mas também em produtos da reação de Maillard (Figura 3.1 [B]), também conhecidos pelo seu efeito antioxidante e neuroprotetor.

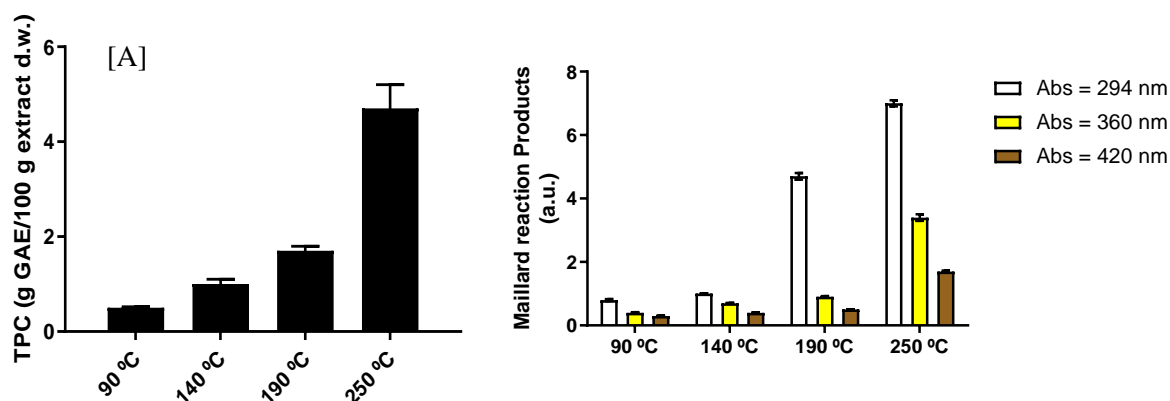


Figura 3.1 – [A] Conteúdo fenólico Total; [B] Produtos das reações de Maillard obtidos no estudo em estudo anterior realizado no GRAQ¹²⁴

3.3 Preparação dos Fitossomas

Os fatores que influenciam a formação de fitossomas são principalmente os solventes, a razão estequiométrica dos constituintes ativos, a temperatura e o tempo de reação.¹⁶⁵

Para a preparação dos fitossomas foi seguido o protocolo definido por estudos prévios realizados no GRAQ onde se definiram as condições ótimas de preparação dos fitossomas seguindo um desenho fatorial do tipo Box-Behnken. Duas condições ótimas resultaram deste desenho fatorial: (condição 1) razão estequiométrica 1:1 dos constituintes ativos e L- α -Fosfatidilcolina, no fundo de um recipiente dissolvida em etanol por aquecimento durante 1 hora a temperatura constante de 59 °C e (condição 2) de 4 horas, a 25°C com uma estequiometria de 1:4. Os complexos preparados foram obtidos por evaporação de modo a remover o solvente sob azoto.

Foram seguidas as primeiras condições (condição 1) de modo a produzir fitossomas em menos tempo (1h), evitar o elevado gasto de L- α -fosfatidilcolina, conseguir um tamanho menor de fitossomas, bem como uma menor polidispersão de tamanho entre fitossomas (avaliados por técnica de *dynamic light scattering*) conforme dados da Figura 3.2, e uma eficiência de encapsulamento superior, de $61,76 \pm 10,11$ % face aos $57,63 \pm 10,65$ % da segunda condição.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	Rácio	R1 (experimental)	Tamanho (nm)	PDI
4	25	1:4	57,63±10,65% (n=7)	261,02±70,46	0,32±0,02
1	59	1:1	61,76±10,11% (n=7)	245,76±49	0,26±0,06

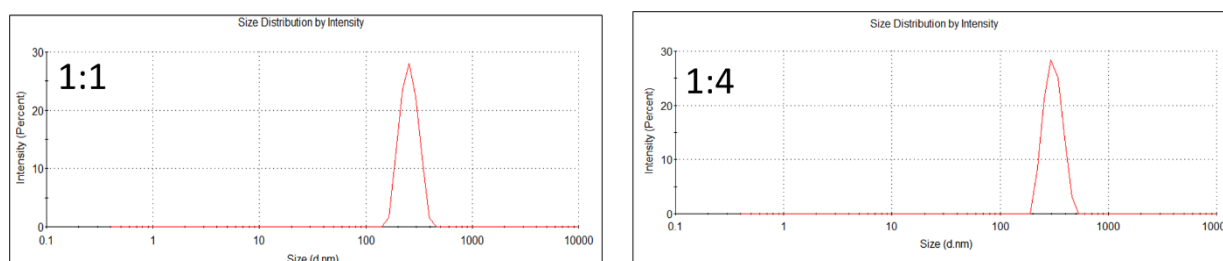


Figura 3. 2 - Distribuição de tamanho dos fitossomas por DLS produzidos nas condições ótimas encontradas em estudo prévio realizado no GRAQ

A produção de fitossomas iniciou-se pela pesagem de 3 mg da fração de *Codium tomentosum* (F4) às quais foram adicionados 30 μ L de L- α -fosfatidilcolina (100mg/mL). Posteriormente efetuou-se uma secagem sob azoto de modo a evaporar o solvente da L- α -fosfatidilcolina, clorofórmio, evitando a sua mistura com o etanol, seguindo-se a adição de 3 mL de etanol. Esta mistura foi colocada sob agitação, a 100 rpm, durante 1 hora em banho a temperatura constante de 59°C, seguida de secagem sob azoto, um gás inerte e, portanto, não reativo, após a qual foram adicionados 3 mL de clorofórmio.

Seguidamente, efetuaram-se 2 filtrações com filtros PTFE (0,22 μ m), próprios para solventes orgânicos, assegurando a remoção de todos os possíveis resíduos do extrato não complexados com o fosfolípido, procedendo-se a uma última secagem com azoto. Apenas o complexo F4-fosfatidilcolina foi permeado através dos filtros de PTFE.

Os fitossomas foram posteriormente funcionalizados com ApoE3 humana, e DSPE-PEG (2000) Amina.

3.4 Caracterização de Fitossomas

3.4.1 Solubilidade e coeficiente de partição octanol-água

A determinação da solubilidade em água ou em solventes orgânicos e o coeficiente de partição n-octanol/água permite caracterizar os constituintes ativos e os complexos de fitofosfolípidos dos constituintes ativos. Geralmente, os fitossomas têm melhor lipofilicidade e hidrofiliabilidade do que os constituintes ativos.¹⁶⁵

A solubilidade foi determinada pela adição do extrato F4 ou do complexo fitossômico a 10 mL de água e 10 mL de n-octanol em ampola de vidro, selada à temperatura ambiente. O líquido foi agitado por 24h à temperatura ambiente, considerado o tempo adequado para que o equilíbrio fosse alcançado. Após separadas as duas fases formadas, foram pesadas amostras com igual massa e posteriormente centrifugadas durante 20 minutos a 1000 rpm, de forma a permitir a dissolução de suspensões do extrato ou complexo restantes. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de PTFE (0,22 µm).^{204,205}

As concentrações das amostras foram determinadas espectrofotometricamente no comprimento de onda característico da fração F4 de *Codium tomentosum* a 280 nm UV.

As curvas de calibração (anexos B.1 e B.2) para cada uma das fases foram feitas previamente utilizando dissoluções da fração F4 em n-octanol e em água.

Durante o procedimento foram utilizados, uma centrífuga (Megafuge™ 16 Centrifuge Series da ThermoFisher Scientific) e um leitor de placas (BioTek Synergy HTX Multimode Reader, Winooski, Vermont, EUA).

A coeficiente de partição foi estimado pela equação 1.

$$K_{ow} = P = C_o / C_w \quad \text{Equação 1}$$

Onde as variáveis independentes, C_o = Concentração na fase octanol e C_w = Concentração da fase aquosa

3.4.2 Espectro ultravioleta

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV – VIS, modelo UV – 2101PC, da Shimadzu (Tokio, Japão), diluídas em 4 mL de clorofórmio, e após serem sujeitas a banho de ultrassons (VWR Ultrasonic Cleaning Bath, Radnor, Pennsylvania, EUA) durante aproximadamente 5 minutos garantindo a correta solubilização. Foi traçado o espectro da fração F4, da L-α-fosfatidilcolina e dos fitossomas no intervalo de comprimento de onda de 200-700 nm.

3.4.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

No DSC, as interações podem ser observadas comparando a temperatura de transição, aparecimento de novos picos, desaparecimento dos picos originais, pontos de fusão e mudanças na área relativa dos picos ¹⁶⁵

O comportamento térmico foi estudado aquecendo $3,0 \pm 0,2$ mg de cada amostra individual em cápsulas de alumínio sob azoto, usando um analisador térmico simultâneo STA 449 F3 *Jupiter*® (NETZSCH, Selb, Alemanha) com rampa de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ de 25°C a 1000°C . ^{204,206,207}

Uma cápsula de alumínio vazia, selada da mesma forma foi usada como referência.

Foram criados termogramas pelo software NETZSCH Proteus®, da L- α -fosfatidilcolina, da fração F4 de *Codium tomentosum* e do fitossoma.

3.4.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é um método rigoroso para análise estrutural e deteta diferentes grupos funcionais que apresentam características distintas em número de banda, posição, forma e intensidade. A formação de complexos de fitofosfolípidos pode ser verificada pela análise da espectroscopia destes com as da fração F4 e da L- α -fosfatidilcolina. ¹⁶⁵

A amostra da fração F4 de *Codium tomentosum* foi triturada com KBr cristalino seco (1:100) em almofariz, seguida de formação de discos circulares transparentes comprimidos sob pressão (10 Ton/nm^2).

As amostras de L- α -fosfatidilcolina e dos complexos não permitiram criar discos pela trituração com o KBr, pelo que foram colocadas diretamente entre as lamelas do espectrômetro.

O espectro foi desenvolvido após varrimento a 4 mm/s com resolução de 2 cm^{-1} e elucidado dentro da região do número de onda de $700\text{--}200 \text{ nm}$. ²⁰⁶

Picos em números de onda específicos no espectro infravermelho da fosfatidilcolina, do fitossoma e do próprio extrato foram comparados de forma a elucidar a ligação química entre a fração rica em compostos fenólicos e fosfolípidos. ²⁰⁶

As amostras foram analisadas no espectrômetro *Nicolet 6700 FT-IR* da Thermo Fisher Scientific, e os gráficos obtidos no software OMNIC™ Spectra.

3.5 Produção dos alimentos funcionais

3.5.1 Iogurte

A produção dos iogurtes seguiu receita pré-definida. Inicialmente foram fervidos 100 mL de três tipos de leite (magro, meio-gordo e sem lactose) durante cerca de 5 a 10 minutos, de modo a permitir a correta dissolução do extrato. Posteriormente foi deixado arrefecer até cerca de 45°C, adicionando-se uma colher de iogurte natural comercial.

Foram produzidos um total de dez iogurtes contendo respetivamente, 0%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, e 0,2% da fração F4 de *Codium tomentosum*, com quantidade de fitossomas para conter 0,01% e 0,15% de F4, e com 0,01% e 0,15% de F4 mas adicionando também amora e framboesa desidratadas.

Os dez iogurtes preparados foram colocados na iogurteira e deixados a fermentar durante aproximadamente 12 horas, após as quais foram armazenados em frigorífico a 4°C.

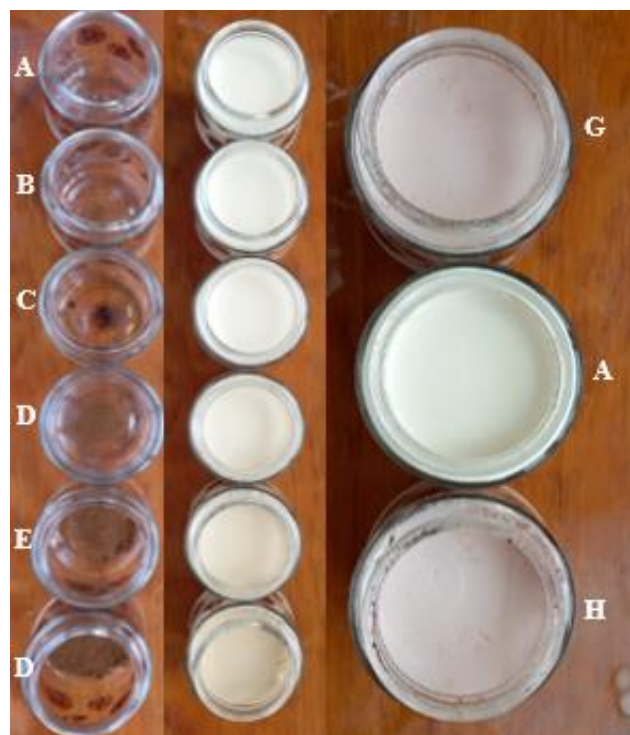


Figura 3. 3 - Preparação do Iogurte contendo respetivamente, 0% [A] 0,005% [B], 0,01% [C], 0,05% [D] 0,1% [E] e 0,2% [F] de extrato de *Codium tomentosum* e com 0,01% [G] e 0,15% [H] de extrato, mas adicionando também amora e framboesa desidratadas.

3.6 Análises físico-químicas dos iogurtes

3.6.1 pH

Os valores de pH foram medidos 4 e 7 dias após o término da etapa de fermentação usando um medidor de pH com eletrodo de vidro calibrado²⁰⁸, mergulhando-o diretamente no iogurte, três vezes consecutivas lavando o eletrodo entre medições com água desionizada (pH-meter Model Crison micro pH 2000, Barcelona, Espanha).

As análises foram realizadas em duplicado.

3.6.2 Acidez

Para determinação da acidez titulável, a 10 mg de iogurte foram adicionados 10 mL de água destilada quente e adicionadas 5 gotas de fenolftaleína, e titulados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio (KHF).^{208,209}

A acidez titulável foi expressa em gramas de ácido láctico/100 g de iogurte, calculada pela Equação 2.

$$\text{Acidez total} = \frac{V(L) \times F(\text{mol/L}) \times A \times D}{\text{massa da amostra inicial (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde V equivale ao volume da solução de NaOH titulada (L), A ao fator de conversão do ácido láctico de 0,009, D ao fator de diluição e F a concentração de 0,0923 mol/L de NaOH.^{208,209}

As análises foram realizadas em duplicado.

3.6.3 Sinérese

A quantificação do soro aquoso formado na superfície dos iogurtes foi determinada centrifugando 20g de amostra (Megafuge™ 16 Centrifuge Series da ThermoFisher Scientific) a 500 rpm durante 10 minutos e posteriormente separando se o líquido filtrando com auxílio de gaze.

A percentagem de sinérese foi calculada segundo a equação 3.

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{\text{Peso do liquido filtrado (g)}}{\text{Peso total da amostra (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

As análises foram realizadas em duplicado.

3.6.4 Índice de Peróxidos

Para a quantificação do índice de peróxidos, a 5 gramas de amostra foram adicionados 30mL de solução de clorofórmio (CHCl₃):ácido etanóico (CH₃COOH) (70:30) e 0,5 mL de iodeto de potássio sobressaturado (KI). Após 1 minuto de repouso, adicionaram-se algumas gotas de amido ((C₆H₁₀O₅)_n) previamente diluído e 30 mL de água destilada. Posteriormente a solução foi titulada com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) (0,01N) até atingir a transparência.²¹⁰

O valor de Peróxido foi estimado pela equação 4.

$$\text{Índice de peróxido } \left(\frac{\text{meq}}{\text{g}}\right) = \frac{\text{normalidade (0,01)} \times \text{volume de titulação (L)}}{\text{massa da amostra (g)}} \quad \text{Equação 4}$$

As análises foram realizadas em duplicado.

3.6.5 Humidade, Sólidos Totais, Matéria orgânica e Matéria inorgânica (Cinzas)

A percentagem de humidade, sólidos totais e matéria orgânica de cada iogurte foi determinada colocando uma amostra de cinco gramas em cadinho de porcelana previamente calcinado e pesado. Posteriormente foi mantido em estufa de secagem por ar aquecido durante 24h a 105°C. Após este período, deixou-se arrefecer em exsiccador e novamente pesado até peso constante.²¹¹

De forma a determinar o teor de matéria inorgânica, foram utilizadas as amostras finais das quais foram determinadas as percentagens de humidade, e colocadas em mufla (Neytech Vulcan Model A-550 Single Set Point Furnace, Lilongwe, Malawi) a 600 °C durante seis horas. O cálculo do teor de cinzas, após devido arrefecimento das amostras em exsiccador²¹², foi efetuado segundo a equação 9.

A percentagem de humidade foi determinada pela equação 5, os sólidos totais pela equação 6, matéria inorgânica pela equação 7 e de matéria orgânica pela equação 8.

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{\text{Massa inicial de amostra (húmida)} - \text{Massa final da amostra (seca)}}{\text{Massa inicial da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Sólidos Totais (\%)} = \frac{\text{Massa final da amostra (seca)}}{\text{Massa inicial da amostra (húmida)}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{\text{Massa da amostra após inceneração}}{\text{Massa inicial da amostra húmida}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Matéria orgânica (%) = Massa inicial da amostra – Hhumidade (%) – Cinzas (%) **Equação 8**

As análises foram realizadas em duplicado.

3.6.6 Minerais Ca, K, Mg e Na

Os minerais Cálcio (Ca), Potássio (K), Magnésio (Mg) e Sódio (Na) foram determinados por absorção atômica com atomização por chama em espectrômetro (ContrAA® 700, Analytik Jena, Jena, Alemanha). O conteúdo mineral foi analisado nas amostras finais da análise do teor de cinzas, de modo a ter já amostras isentas de matéria orgânica às quais foi adicionado 1mL de ácido nítrico (HNO₃) em balão volumétrico de 100mL, e o restante volume perfeito com água ultrapura. Esta solução foi diluída com a solução de 1% HNO₃ sempre que necessário.
213,214

Foram traçadas curvas de calibração pela leitura de soluções padrão de Mg, Ca, K e Na, apresentadas no Anexo B.

O comprimento de onda do espectrômetro foi fixado em 422,7 nm para Ca, 589,6 nm para Na, 766,5 nm para K e 285,2 nm para Mg. As análises foram realizadas em triplicado.²¹⁴

Além da concentração destes minerais foi ainda calculado o teor de sal segundo o Regulamento (EU) n.o 1169/2011 de 25 de outubro de 2011²¹⁵, pela equação 9.

Teor de Sal (%) = Na (%) x 2,5 **Equação 9**

3.6.7 Lípidos Totais

Os lípidos foram extraídos das amostras por pequenas alterações ao método de Folch^{216,217}. Duas gramas de amostra foram misturadas com 40 mL de cloróformio (CHCl₃):metanol (CH₃OH) (2:1, v/v) em falcon de 50mL e centrifugadas a 2500 rpm por 10 min. De seguida, foram adicionados 8 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,73%) e novamente centrifugadas a 2500 rpm durante 15 min de modo a separar o sistema bifásico. A fase aquosa superior foi eliminada e a inferior transferida para tubo previamente pesado adequado a evaporador rotativo onde foi efetuada a evaporação dos solventes a 45°C. O resíduo obtido foi deixado em repouso por 24 horas em exsiccador e posteriormente pesado.

O cálculo da percentagem de lípidos totais foi efetuado pela equação 10.

Lípidos Totais (%) = $\frac{\text{Massa da amostra final (tubo+ residuo seco)} - \text{Peso do tubo (vazio)}}{\text{Massa da amostra inicial}} \times 100$ **Equação 10**

As análises foram realizadas em duplicado.

3.6.8 Proteínas

A percentagem de proteínas foi determinada segundo o método de Kjeldahl. Foram pesadas dois gramas de cada amostra em tubo de digestão (250 mL), adicionadas três pastilhas de catalisador (0,3% de sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 12 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 96%). A digestão foi efetuada gradualmente até 420° até que a amostra apresentasse um aspeto incolor.

Após a digestão os tubos foram deixados arrefecer. De seguida, foram adicionados a cada tubo 75 mL de água desionizada. Em simultâneo prepararam-se matrizes com 25 mL de solução de ácido bórico (H_3BO_3) a 2%. Os tubos contendo as amostras e os matrizes preparados foram colocados no destilador. Na solução final da digestão foram adicionados 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 40%. A destilação teve a duração de aproximadamente 4 minutos.

No final o azoto amoniacal formado presente no destilado foi titulado com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M usando como indicador o vermelho de metilo e verde de bromocresol. O ponto final da titulação foi detetado pela mudança de cor da solução de verde para rosa acinzentado.

A percentagem de proteína foi determinada segundo o Regulamento (EU) n.º 1169/2011 de 25 de outubro de 2011²¹⁵, pela equação 11.

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{\text{Normalidade HCL (0,1)} \times V \text{ (L)} \times 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{N}}{\text{massa da amostra inicial (g)}} \times 100 \times F \quad \text{Equação 11}$$

Onde F equivale ao fator de conversão da percentagem de azoto para percentagem de proteína, que no caso de derivados do leite é de 6,25 e V ao volume de ácido clorídrico (HCl) gasto na titulação.

3.6.10. Determinação de Açúcares Totais

Para a determinação dos açúcares totais, seguiu-se o método fenol-sulfúrico. Primeiramente foram extraídas as gorduras, e para isso, a um grama de cada amostra foram adicionados 20 mL de n-hexano (C_6H_{14}), e o sistema homogeneizado por ultrassons durante cinco minutos e centrifugação a 9000 rpm durante dez minutos. No final o n-hexano (C_6H_{14}) foi decantado e à solução resultante adicionados 20 mL de solução etanólica ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 75%), após homogeneização a solução foi colocada em banho-maria a 80°C com agitação constante a

100 rpm durante quinze minutos, após os quais foi ainda centrifugada a 9000 rpm durante vinte minutos.^{218,219}

A 2 mL do sobrenadante foram adicionados 1,5 mL da solução etanólica (C₂H₅OH 75%), 0,05 mL de solução fenol (C₆H₆O 80%) e 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Após agitação a solução resultante formou uma coloração alaranjada, analisando-se em leitor de microplacas por UV-Vis (Synergy HTX Multi-Mode Reader) a 480 nm para pentoses e ácidos urónicos e a 490 nm para hexoses (estruturas ilustradas na Figura 3.4.).²¹⁹

Para a construção das curvas de calibração (Anexo C) foram preparadas quatro concentrações a partir de solução padrão de glucose (1 mg/mL) de 0,05, 0,1, 0,15 e 0,2 mg/mL.²²⁰

Para cada amostra, a medição foi repetida em triplicado.

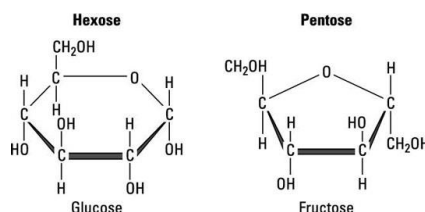


Figura 3. 4 – Estrutura dos Carboidratos: Hexose e Pentose

3.6.11. Valor energético

Para a determinação do valor energético de cada iogurte produzido, foi seguido o disposto no regulamento (EU) n.o 1169/2011 de 25 de outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios²¹⁵, pela equação 12.

$$\text{Valor energético} \left(\frac{\text{Kcal}}{\text{g}} \right) = \text{Hidratos de carbono (g)} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} + \text{Proteínas (g)} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} + \text{Lípidos(g)} \times 9 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \quad \text{Equação 12}$$

3.6.12. Ensaio de inibição das enzimas AChE e BuChE

O ensaio em microplaca para medir a atividade de inibição da AChE e da BuChE foi modificado a partir do ensaio descrito por Ellman, onde a atividade da enzima é medida seguindo o aumento da cor amarela produzida a partir da tiocolina quando esta reage com o fão ditiobisnitrobenzoato.²²¹

Este método colorimétrico baseia-se na medição por espectrofotometria do número de moléculas de tiocolina pela reação com o ácido 5,5-bisditionitrobenzóico (DTNB), resultando na formação do anião 5-tio-2- nitrobenzoato (TNB²⁻). A cor deste produto é amarela e tem absorvância máxima em 405 nm.²²¹

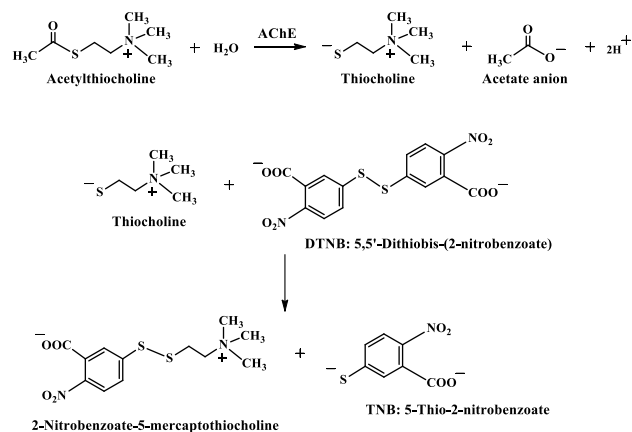


Figura 3. 5 - Reação química durante o ensaio de colorimetria

Em cada poço da microplaca foram adicionados, 25 μ L de ATCI/BTCI, conforme o ensaio, 125 μ L de DTNB, 50 μ L de Tampão B (50mM Tris-HCl, pH 8 com 0,1 % albumina), 25 μ L de amostra dissolvida em tampão A (50 mM Tris-HCL (pH=8)) e 25 μ L de AChE/BuChE. As concentrações finais de iogurte no poço correspondem a 2 e 4 mg/mL. Em cada microplaca foi sempre criada uma linha de branco, contendo todos os reagentes à exceção da enzima, com o intuito de subtrair a cor à amostra. A galantamina foi usada como controlo positivo ($IC_{50} = 0,92 \mu\text{g/mL}$ contra a AChE e $IC_{50} = 4,92 \mu\text{g/mL}$ contra a BuChE) e tampão Tris-HCl como controle negativo.¹²⁴

A leitura no leitor de placas (Synergy HTX Multi-Mode Reader) foi efetuada a 405nm (cinética, durante 2 minutos, efetuando 6 leituras).

A percentagem de inibição foi determinada com base na Equação 13.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(declive_{C-Cb} - declive_{A-Ab})}{(declive_{C-Cb})} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Onde, C corresponde ao controlo, Cb ao branco do controlo, A à amostra, e Ab ao branco da amostra.

3.7 – Análise sensorial

Para a análise sensorial foi efetuada foi selecionado um grupo restrito de provadores informais devidamente informados, não treinados, com o objetivo de verificar possíveis alterações no aroma, paladar, cor e textura dos iogurtes com extrato integrado sendo usado o método afetivo, onde se expressou essencialmente a opinião pessoal de cada provador.

4. Análise e Discussão de resultados

4.1 Caracterização dos fitossomas

4.1.1 Composição: ApoE3 e DSPE-PEG

Acredita-se que a acumulação de A β no cérebro desempenhe um papel crucial na patogénese da DA. Uma das formas de início da DA é caracterizada por um comprometimento geral na depuração de A β . Portanto, o desenvolvimento de nanomedicina que facilite a depuração de A β representa uma estratégia promissora para intervenção na DA.²²²

A inclusão de ApoE3 baseou-se em estudos que verificaram que a adição da mesma à formulação de fitossomas demonstra alta afinidade de ligação tanto ao monómero quanto ao oligómero A β , e acelera a degradação microglial, astrogliar e hepática de A β , facilita o transporte lipossomal, aumenta a eficiência de penetração na barreira hematoencefálica, e a afinidade de ligação de A β . A sua administração consegue ainda acesso ao sistema nervoso central, melhora as alterações neurológicas e reduz a perda de memória característicos de DA.²²²

Por outro lado, a absorção de nanopartículas pode ser comprometida devido ao grande tamanho e hidrofobicidade da partícula. Para contornar os problemas de penetração celular e simultaneamente melhorar a especificidade, os medicamentos nanoparticulados têm sido associados a ligantes direcionados que se ligam às superfícies das células malignas e entram nas células por endocitose mediada por recetores. Por estas razões, a utilização da DSPE-PEG (2000) peptídeo visou melhorar a especificidade do direcionamento das nanopartículas formuladas, e auxiliar a nanopartícula a evitar os processos de digestão, principalmente a gástrica.²²³

4.1.2 Solubilidade e coeficiente de partição

O estudo da solubilidade da fração F4 *Codium tomentosum* e do fitossoma são apresentados na Tabela 4.1 e comparados nos gráficos da Figura 4.1. A fração F4 apresenta elevada solubilidade aquosa (95%), enquanto a solubilidade em n-octanol é bastante reduzida (5%), o que seria de esperar devido ao carácter altamente aquoso desta fração. No entanto esta baixa lipossolubilidade característica do extrato restringe a sua resposta terapêutica.²²⁴

Ainda que a solubilidade aquosa do fitossoma tenha sofrido um decréscimo não muito acentuado em comparação com a fração não encapsulada, apresentou melhoria significativa na solubilidade em n-octanol atribuída à modificação físico-química, bem como à amorfização do extrato durante a complexação com a L- α -fosfatidilcolina anfifílica.²²⁵

A complexação do extrato com o fosfolípido confere um carácter amorfo ao sistema e modera o carácter lipofílico, melhorando a sua solubilidade e perfil de dissolução.²²⁶

Por fim, pela análise do valor do coeficiente de partição dos fitossomas em comparação com o do extrato constata-se mais uma vez o aumento da lipofilicidade.

Tabela 4. 1 - Dados referentes à solubilidade em água e n-Octanol e respetivos coeficientes de partição

Amostra	Solubilidade em H ₂ O		Solubilidade em n-Octanol		Kow
	(mg/mL)	(%)	(mg/mL)	(%)	
Extrato	13,5	95%	0,712	5%	0,0530
Fitossoma	10,6	72%	4,03	28%	0,382

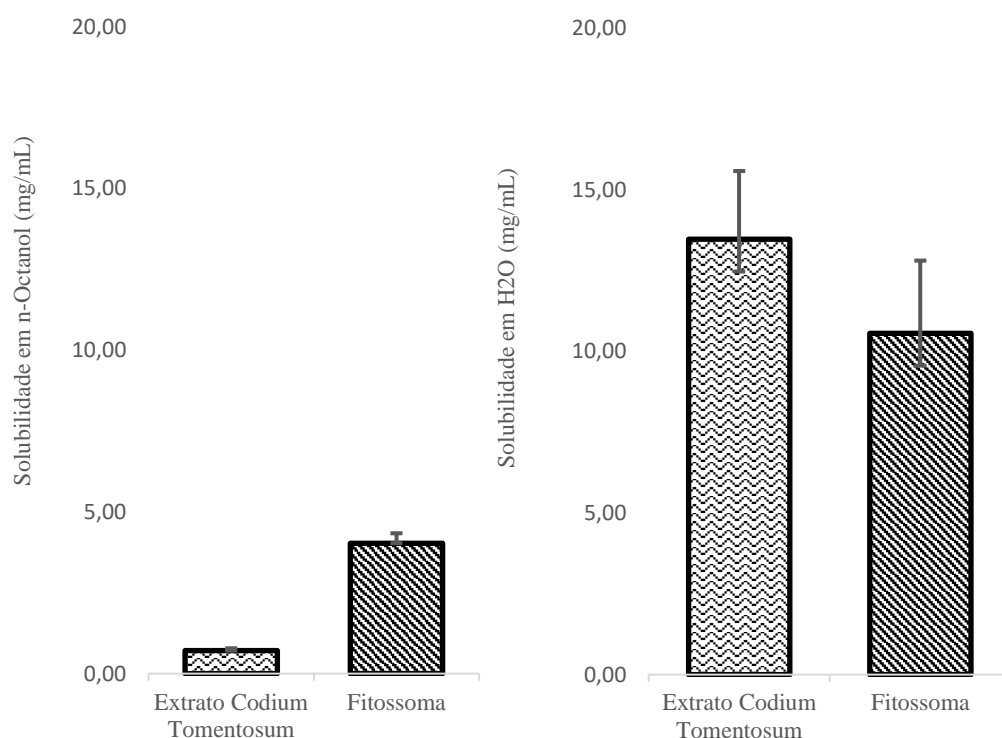


Figura 4. 1 - Estudo da solubilidade em água e n-Octanol do extrato *Codium tomentosum* e do Fitossoma

4.1.2 Espectro ultravioleta (Espectro UV)

Amostras que refletem absorção diferente na faixa de comprimento de onda UV podem ser usadas para caracterizar as próprias propriedades estruturais. A maioria dos estudos não revelou diferenças nas características de absorção de UV dos constituintes antes e depois da complexação, concluindo-se que os cromóforos dos compostos não são afetados por serem complexados com fosfolípidos.¹⁶⁵

Os espectros UV da L- α -fosfatidilcolina, da fração F4 e do fitossoma são apresentados na Figura 4.2.

O pico característico de absorção da fração F4 de *Codium tomentosum* (280 nm) manteve-se presente no do fitossoma sugerindo que ocorreram interações físicas fracas entre o extrato e a L- α -fosfatidilcolina durante a formação do complexo.²²⁷

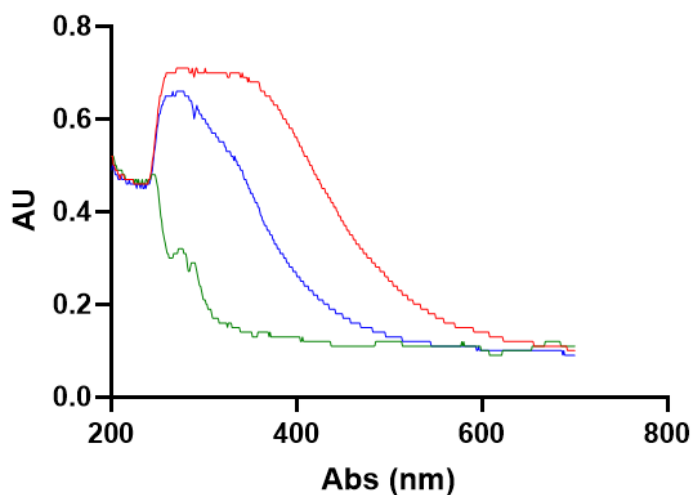


Figura 4. 2 - Espectro UV das amostras: [Vermelho] Fitossomas com fração F4; [Azul] Fração F4; [Verde] Fosfatidilcolina

4.1.2 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Os termogramas da fração F4 de *Codium tomentosum*, da L- α -fosfatidilcolina e do fitossoma estão representados na Figura 4.3 com a cor azul, verde e vermelho, respetivamente. A fração F4 exibiu um primeiro pico endotérmico a 49,2 °C característico de uma primeira absorção de calor característica das algas por evaporação do seu teor de humidade, em 377,5 °C exibiu um pico de fusão nítido e de alta intensidade, seguidos de rápida decomposição a 500 °C.^{228,229}

A L- α -fosfatidilcolina apresentou três picos endotérmicos de baixa intensidade, largos e difusos, o primeiro pico a 249,5 °C que é indicativo da fusão da região polar dos fosfolípidos. Os dois últimos picos a 355,8 °C e 391,4 °C surgem devido à fusão térmica das caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos levando à transição de fase do estado gel para líquido cristalino.^{224,229}

O complexo fitossomal não apresentou nenhum dos picos característicos da fração F4 de *Codium tomentosum*, ou da L- α -fosfatidilcolina, apresentando um novo pico endotérmico completamente diferente dos observados nos constituintes individuais, de muito baixa intensidade a 462,5 °C. Além disso, o pico de fusão acentuado da fração F4 de *Codium tomentosum* desapareceu, indicando a sua amorfização, indicando o aparecimento das novas

ligações de hidrogénio entre os grupos -OH dos anéis fenólicos do extrato com o fosfolípido. Um comportamento de fusão DSC completamente diferente, além das ligações fracas de hidrogénio, indica ainda a ocorrência de forças de van der Waals ou forças ião-dipolo entre o extrato e o fosfolípido. Assim, sugere-se que o processo de formulação dispersou completamente a fração F4 dentro da matriz fosfolipídica, levando à formação do complexo fitossómico amorfo e estável. ^{224,229}

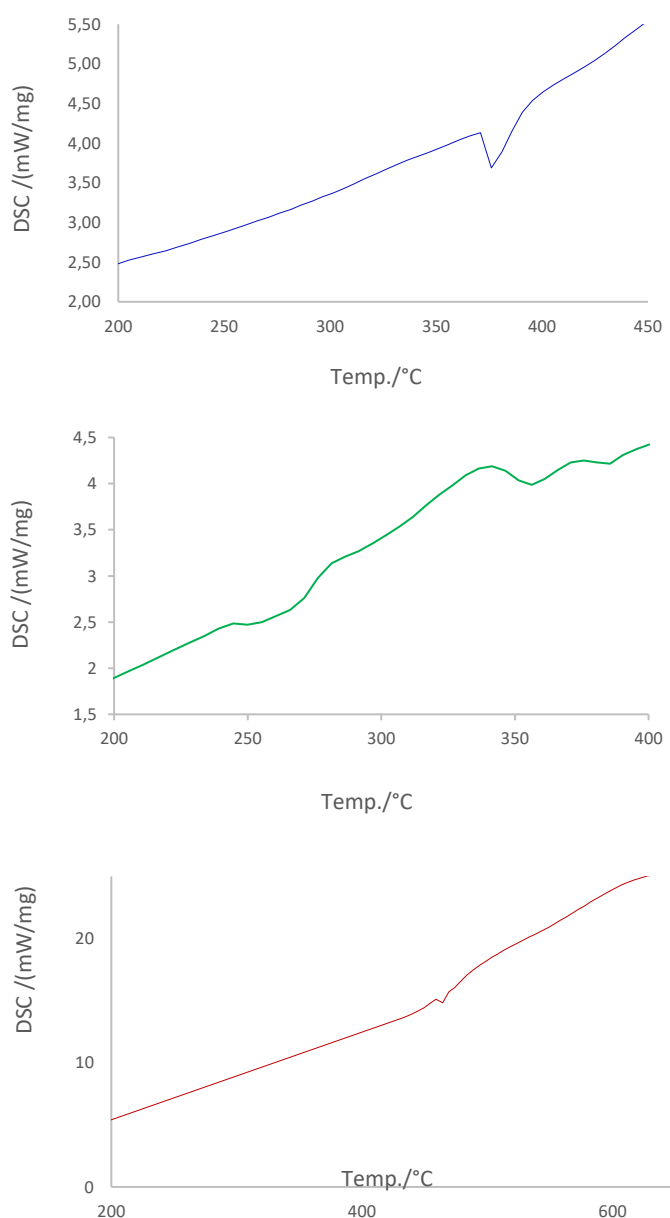


Figura 4. 3 – Termogramas DSC: [Azul] Extrato; [Verde] Fosfatidilcolina; [Vermelho] Fitossomas com extrato;

4.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A possível interação entre a fração F4 de *Codium tomentosum* e a L- α -fosfatidilcolina no fitossoma foi estudada por espectroscopia IR (Figura 4.4).

Os espectros de FTIR do complexo fitossômico (Figura 4.4 [c]) confirmaram a ligação química entre os compostos da F4 de *Codium tomentosum* e a L- α -fosfatidilcolina.

Os picos em 3416,62, 3289,81 e 3369,38 cm^{-1} representam o grupo O-H alcoólico na região IR do extrato (Figura 4.4 [a]), do complexo fitossomal (Figura 4.4 [c]) e da L- α -fosfatidilcolina (Figura 4.4 [b]), respectivamente.

Os sinais de absorção a 2922,01 da fração F4 e 2854,92 cm^{-1} do complexo representam o alongamento C-H característico da cadeia longa de ácidos gordos, os picos a 1664,39 do extrato e 1667,26 do complexo representam o alongamento da ligação dupla C=O, alusivos também à existência de aromaticidade, e no caso da fração F4 aparece o pico a 1079,99 cm^{-1} para o alongamento COC de éter.²³⁰

O espectro FTIR da L- α -fosfatidilcolina (Figura 4.4 [b]) marcou a presença de múltiplos sinais de absorção característicos, que apareceram em 2925,81 e 2854,71 cm^{-1} representando a banda de alongamento C-H característica da cadeia longa de ácidos gordos. O sinal a 1735,17 cm^{-1} é característico da ligação C=O, banda reconhecida do alongamento característico do éster de ácido gordo.²³⁰

Além destes, alguns sinais adicionais também foram observados em 1247,26, 1215,94 cm^{-1} , para P=O, característicos do grupo funcional dos fosfatos, 1090,92 de alongamento P-O-C e 969,12 cm^{-1} para $-\text{N}^+(\text{CH}_2^{231})_3$ de acordo com estudos anteriores.^{225,232}

Não foram observados novos picos significativos no complexo (Figura 4.4 [c]). No entanto, o pico C=O da fração F4 foi deslocado no complexo para comprimentos de onda superiores, surgiram ainda bandas de absorção nítidas em 1234,51 cm^{-1} características, no caso de complexos, das fortes ligações C–O provando a formação de novas ligações. Houve também um alargamento da banda fenólica característica (O-H) causada pela formação de ligações de hidrogênio, sinal de que a formulação de fitossomas foi bem-sucedida.²³³

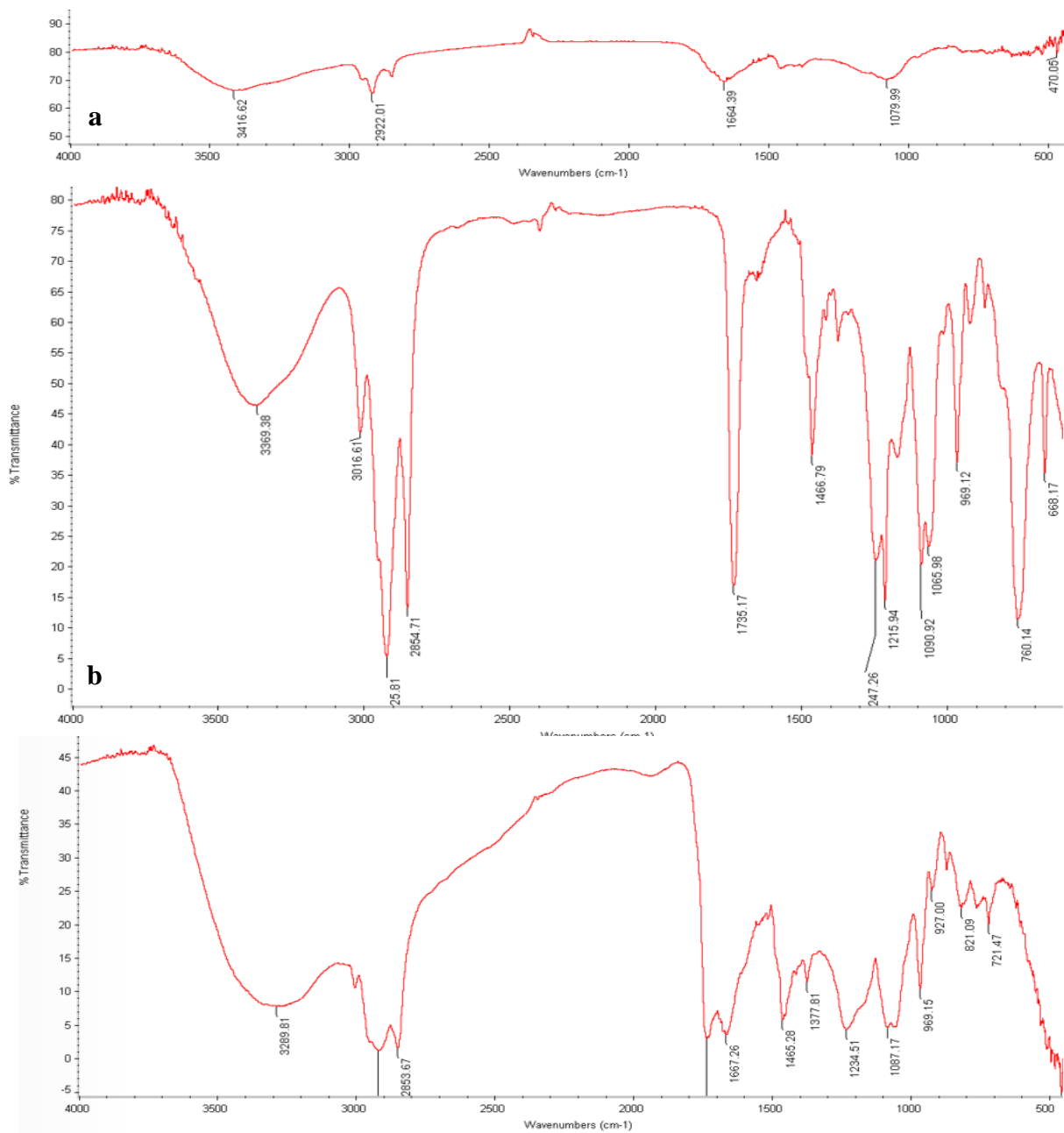


Figura 4. 4 - Espectros FTIR: *Codium tomentosum* [a], L- α -Fosfatidilcolina [b], Complexo Fitossômico [c]

4.2 - Caracterização dos alimentos funcionais

4.2.1 Inibição da AChE e BuChE

Segundo a hipótese colinérgica de que a deficiência de memória em pacientes com DA são resultado de um defeito do sistema colinérgico, atualmente, uma possível abordagem para o tratamento desta doença passa pela tentativa de aumentar os níveis de acetilcolina (ACh) no cérebro. ^{234,235}

A ACh é um neurotransmissor que quando libertado na fenda sináptica, se liga a recetores pós-sinápticos em resposta à estimulação nervosa. Pode ser inativada por clivagem, ao ser catalisada pela enzima AChE, da qual resultam uma molécula de colina e um grupo acetato. A perda gradual da ACh foi associada à deterioração cognitiva progressiva, deterioração das funções neuromusculares e, conseqüentemente, à diminuição da autonomia. Com base nestes pressupostos, são usados na terapêutica atual alguns inibidores da AChE. No entanto, devido à sua fraca eficácia em doentes cuja doença já se encontra numa fase avançada de progressão, estão a ser investigados novos inibidores de AChE para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer. ²³⁶⁻²³⁸

Além da AChE, a enzima BuChE está também envolvida na hidrólise de ACh. A BuChE possui um padrão de distribuição cerebral diferente do da AChE, enquanto a AChE se projeta difusamente para o córtex, modulando o processamento cortical e as respostas a estímulos novos e relevantes, a BuChE projeta-se especificamente para o córtex frontal e pode ter intervenção na atenção, memória emocional e comportamento. Além disso, a atividade da BuChE aumenta progressivamente à medida que a gravidade da demência avança, enquanto a atividade da AChE diminui. Portanto, a inibição de BuChE pode fornecer benefícios adicionais. ^{237,238}

As amostras recolhidas dos iogurtes produzidos integrando percentagens de extrato inferiores a 0,15% apresentaram inibição da AChE e BuChE inferior a 10%, pressupondo-se que se deva à baixa concentração de extrato colocada em cada iogurte (Figura 4.5).

Das amostras testadas, observa-se que os iogurtes controlo não apresentaram inibição das colinesterases ou apresentaram fraca inibição (no caso da BuChE). De uma forma geral, os iogurtes contendo fitossoma com 0,01% de fração F4 apresentam uma capacidade de inibição da AChE semelhante aos iogurtes contendo 0,01% de fração F4 não encapsulada + fruta desidratada. No entanto, no caso da BuChE, a adição de fruta não permitiu atingir a mesma percentagem de inibição que a verificada para os iogurtes sem fruta, revelando um certo efeito antagónico. De todos os iogurtes preparados, o que apresentou melhores resultados (30% de inibição da AChE) foi o iogurte contendo uma percentagem de fração F4 de 0,15% (4 mg/mL de amostra) (Figura 4.5).

Ainda que as percentagens de inibição obtidas sejam relativamente baixas devido aos iogurtes fabricados integrarem percentagens bastante baixas da fração F4 e fitossomas, sabe-se

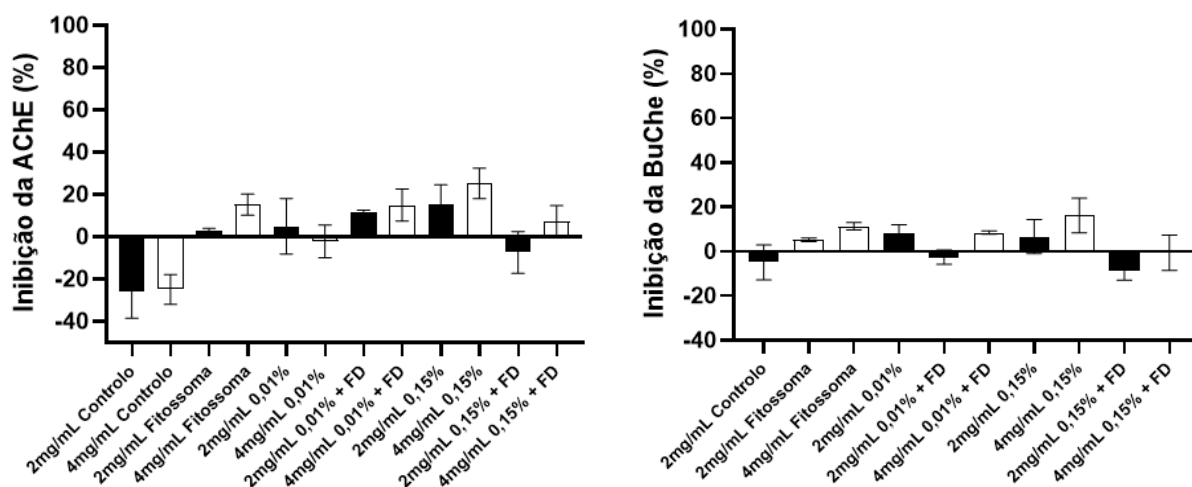


Figura 4.5 - Gráficos de % de inibição das colinesterases (AChE e BuChE) pelos iogurtes fabricados

que a fração F4 de *Codium tomentosum* apresenta elevada percentagem de inibição das colinesterases¹²⁴ (Figura 4.6) e, portanto, por efeito cumulativo a possibilidade de se alcançar inibição pelo consumo destes iogurtes não deve ser descartada. Ainda que as percentagens de inibição obtidas sejam relativamente baixas devido aos iogurtes fabricados integrarem percentagens bastante baixas de extrato e fitossomas, sabe-se que o extrato apresenta elevada percentagem de inibição das colinesterases¹²⁴ (Figura 4.6) e, portanto, por efeito cumulativo a possibilidade de se alcançar inibição pelo consumo destes iogurtes não deve ser descartada.

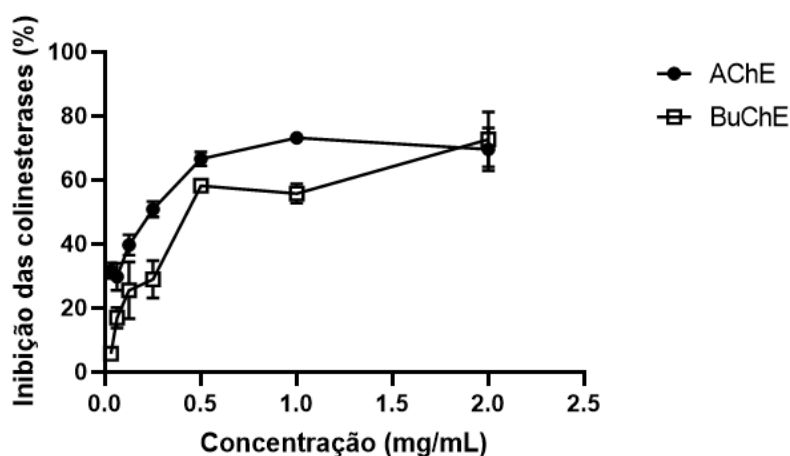


Figura 4.6 - Gráfico de % de inibição das colinesterases (AChE e BuChE) da F4 do extrato *Codium tomentosum*¹²⁴

4.2.2 pH e Acidez

De acordo com o presente estudo, a inclusão da fração F4 de *Codium tomentosum* ou fitossomas não alteraram significativamente os valores de pH entre amostras nos primeiros dias de armazenamento, tendo sido o menor valor obtido ao sétimo dia de armazenamento no iogurte contendo 0.01% de extrato e fruta desidratada (pH = 4,23), e o mais elevado no iogurte ao qual foi adicionada uma percentagem de 0,05% de extrato, de 4,38.

Entretanto, durante o tempo de armazenamento, observou-se que os valores de pH diminuíram ligeiramente entre o quarto e sétimo dia em todas as formulações de iogurtes (Figura 4.7), apresentando taxas decrescentes entre estes dois momentos de análise, de 1,80% a 8,65%. Este decréscimo deveu-se, provavelmente, ao crescimento de bactérias que transformam a lactose em ácido láctico durante o armazenamento, conforme relatado noutros estudos.²³⁹

Notou-se, no entanto, que o pH das amostras que continham a fração F4 ou fitossomas teve uma redução menor, em média 3%, em comparação com os iogurtes de controlo onde não foi adicionado extrato ou fruta desidratada, em média de 6%. Esta observação poderá ser atribuída à atividade antibacteriana característica dos compostos fenólicos presentes nos extratos, conforme descrito em estudos anteriores, inibindo o crescimento das bactérias.^{240,241}

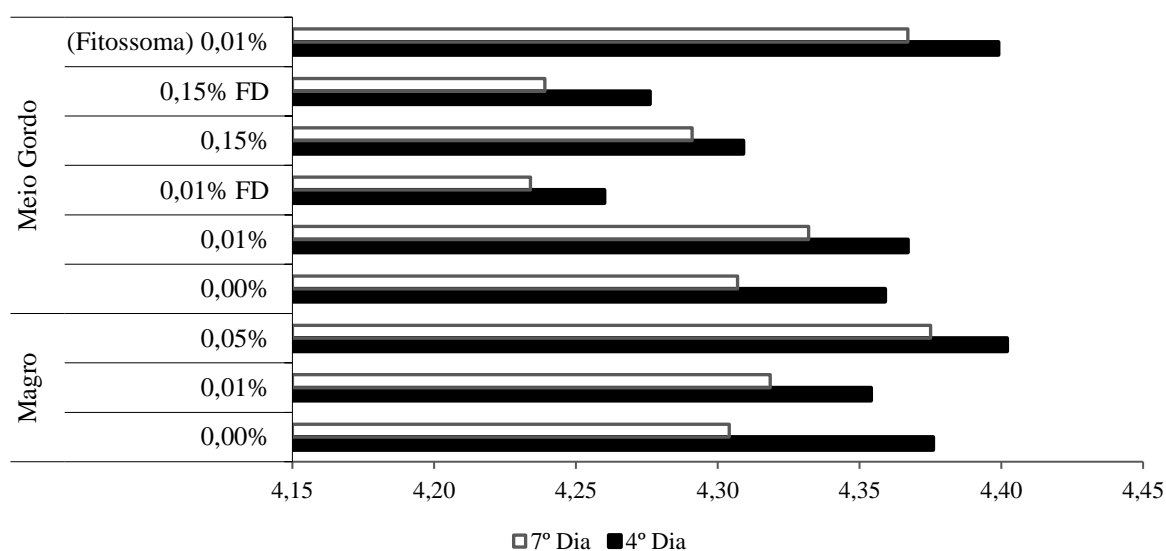


Figura 4.7 - Comparação dos valores de pH das amostras de iogurte ao 4º e sétimo dia de armazenamento

À semelhança do que ocorreu ao valor de pH, a adição da fração F4, ou fruta desidratada não afetou significativamente os níveis de acidez (representados pelas linhas da figura 4.8) do

iogurte quando comparados com os de controlo, no entanto, ao sétimo dia de armazenamento os resultados indicaram que o valor da acidez no iogurte de controlo (mínimo de 0,81353 gramas de ácido láctico por 100 gramas de iogurte) e com adição da fração F4 (mínimo de 0,71328 gramas de ácido láctico por 100 gramas de iogurte), foi maior do que as amostras contendo fitossomas (0,678 gramas de ácido láctico por 100 gramas de iogurte), comprovando que as amostras encapsuladas foram mais estáveis durante o armazenamento, tendência atribuída ao efeito da proteção do encapsulamento em estudos anteriores.²⁰⁹

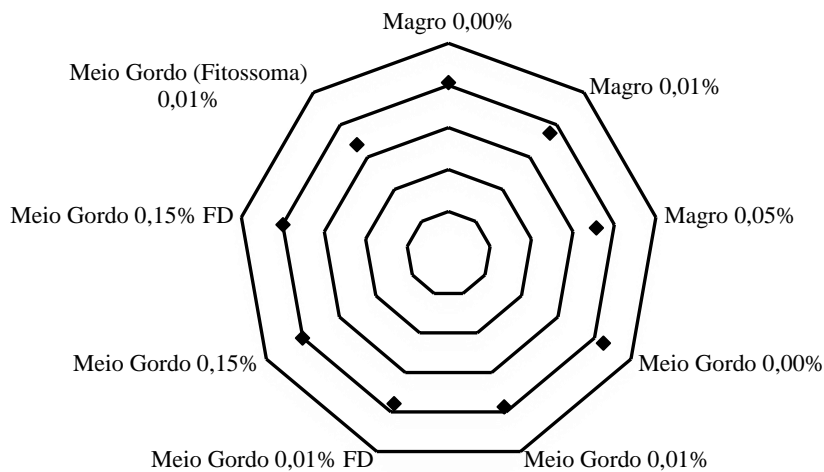


Figura 4.8 - Dispersão dos valores de acidez das amostras de iogurte

A diminuição do pH e o aumento da acidez durante o armazenamento podem ser atribuídos à alta atividade metabólica das bactérias ácido lácticas, que hidrolisam a lactose, produzem ácido láctico e degradam ácidos gordos, reduzindo o pH e aumentando a acidez.²⁴²

A tendência observada nestes dois parâmetros esteve de acordo com estudos anteriores que a atribuíram também à capacidade tampão relativamente alta do leite.²⁴³

Os valores de acidez de todas as amostras de iogurte estavam na faixa de 0,92 a 1,27% de ácido láctico, que está dentro da faixa padrão mínima (0,60 a 1,5% de ácido láctico), conforme descrito pela Codex Alimentarius Commission.²⁴⁴

4.2.4 Humidade, Sinérese e Matéria Orgânica

A humidade e a sinérese são atributos físicos importantes do iogurte, pois podem influenciar a aceitabilidade e até mesmo limitar o tempo de vida útil do produto, ao causar uma aparência indesejável.²⁴⁴

A sinérese envolve o rearranjo espontâneo da rede de gel de iogurte, resultando na separação do soro.²⁴⁵ Em estudos anteriores, iogurtes fortificados com extratos de plantas ou frutas apresentaram menor sinérese devido à formação de complexos estáveis entre compostos fenólicos e caseína, que poderiam conter mais soro de iogurte pela estabilização da matriz de gel, também ligada à afinidade do extrato por sistemas aquosos.^{246,247}

No entanto no presente estudo verificou-se uma tendência oposta com o acréscimo da percentagem de extrato incluído no iogurte, embora a percentagem de humidade se tenha mantido, a libertação do soro aumentou consideravelmente (Fig. 4.9). Aparentemente não terá ocorrido a correta ligação entre o leite e a fração F4 de *Codium tomentosum* durante a fermentação, evidente pela deposição do mesmo no fundo dos recipientes, e comprovado pelo aumento da percentagem de matéria orgânica com o aumento da percentagem de extrato.²⁴⁸

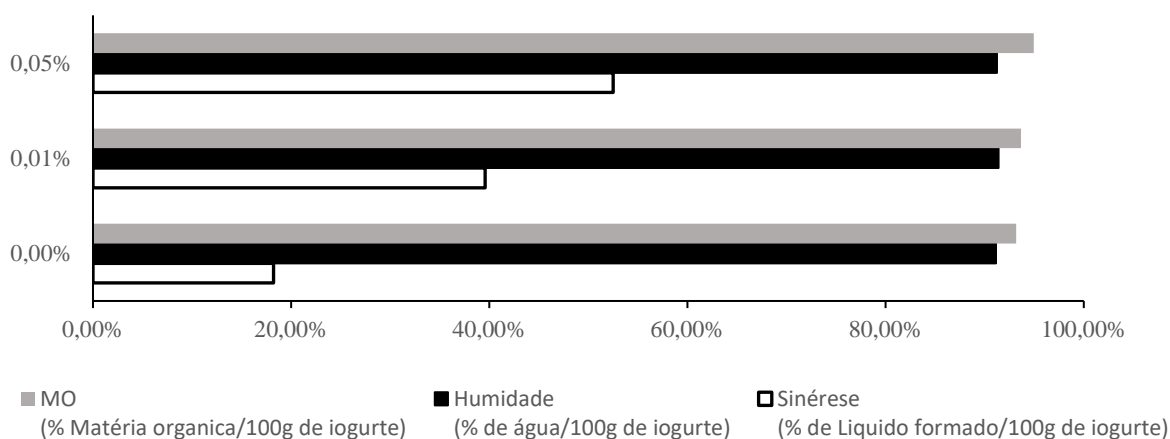


Figura 4.9 - Comparação da alteração da percentagem de matéria orgânica, humidade e sinérese com o aumento da percentagem de extrato F4

4.2.5 Índice de Peróxido e Lípidos Totais

A oxidação lipídica foi determinada por análise dos peróxidos lipídicos. No caso dos iogurtes com adição da fração F4 de *Codium tomentosum*, com o aumento da percentagem de lípidos, ligada ao conteúdo lipídico de $2.2 \pm 0,1$ g/100 g da alga¹²⁴, verificou-se um aumento do índice de peróxidos.

Ao quarto dia tanto os iogurtes controlo (sem aditivos), ou contendo F4 e fitossomas não apresentaram valor de peróxido, enquanto, ao sétimo dia este valor aumentou consideravelmente para os iogurtes que integraram 0,01% e 0,15% de fração F4, até 0,048 meq/100 gramas no iogurte contendo 0,15% de F4 e fruta desidratada (Figura 4.9) enquanto no iogurte controlo não se verificou a peroxidação. No caso do iogurte controlo, alguns estudos reportaram a capacidade de inibição da peroxidação do ácido linoleico, por algumas estirpes de

bactérias produtoras de ácido láctico.²⁴⁹ O aumento do índice de peróxidos após a adição dos extratos, poderá estar relacionado com a inibição das bactérias presentes no iogurte, tal como reportado anteriormente na secção 4.2.2, diminuindo assim o efeito destas bactérias na inibição da peroxidação dos ácidos gordos do iogurte.

Para o iogurte contendo fitossomas, embora também tenha apresentado valor de peróxidos de 0,006 meq/100 gramas, associado ao facto de a fosfatidilcolina ser altamente insaturada e a predominância de ácidos gordos polinsaturados gerar hidroperóxidos e produtos de oxidação secundária, o valor de peróxidos lipídicos foi bastante inferior em comparação aos restantes iogurtes que integraram extrato, de acordo com estudos anteriores que referem que a inibição da peroxidação lipídica pode ser consequência da combinação de mecanismos como a propriedade antioxidante intrínseca dos compostos adicionados e dos seus efeitos nas propriedades da membrana ao limitar a penetração de oxigénio molecular na bicamada lipídica, sendo que os extratos utilizados no presente estudo foram relatados como tendo capacidade antioxidante, que normalmente é maior no caso de compostos fenólicos.²⁵⁰

Tornou-se evidente que a nanoencapsulação, mesmo aumentando consideravelmente o teor de lípidos, protegeu os ácidos gordos insaturados dos fatores de deterioração, como a oxidação, conforme reportado em estudos anteriores.^{251 209}

Comparativamente com valores rotulados, em média de 0,03%/100g de iogurte, os iogurtes contendo extrato apresentaram valores tendencialmente inferiores estando de acordo com estudos anteriores reportaram a diminuição do teor de gordura de iogurtes pela integração de compostos de origem vegetal, evidenciando uma possível influencia no metabolismo da gordura pelo extrato levando à sua diminuição.^{151,152}

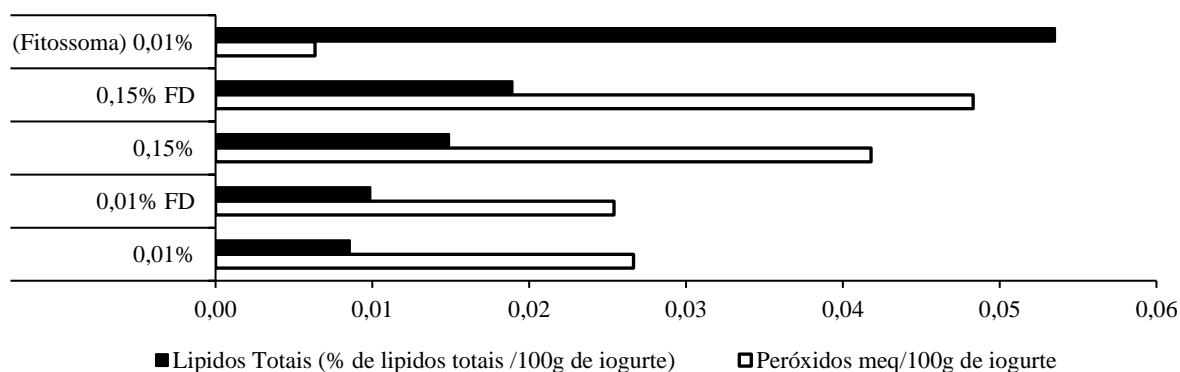


Figura 4. 10 - Comparação do valor de Lípidos Totais e Peróxidos Lipídicos das amostras de iogurte produzidos

4.2.6 Matéria inorgânica (Cinzas) e Minerais (Ca, K, mg e Na)

O teor de cinzas aumentou com o aumento da percentagem da fração F4 introduzida nos iogurtes, até um máximo de 7,82% em comparação com o iogurte de controlo, que apresentou

um valor de 5,20%. Conseqüentemente os valores dos minerais totais por cada 100 mL de iogurte (Fig 4.11) também são maiores nos iogurtes com adição de extrato. Este aumento poderá estar ligado à alta concentração de minerais característica das algas marinhas extraídos durante a preparação dos extratos.¹²⁶

Os valores para os teores de minerais quantificados nos iogurtes preparados neste trabalho são semelhantes aos valores reportados na literatura para a maioria dos minerais: Ca $82,4 \pm 1,2$ a $124,1 \pm 1,9$; Mg $7,0 \pm 0,1$ a $10,7 \pm 0,1$, Na $42,6 \pm 0,6$ a $63,0 \pm 1,0$ e K $121,3 \pm 1,8$ a $178,5 \pm 2,7$ mg/100 mL para diferentes tipos de iogurte, apresentando valores superiores para Mg e Na. Concordando com estudos anteriores que demonstraram que o Na é um dos minerais presentes com maiores teores em algas marinhas.^{252,253}

Os valores de minerais quantificados nos iogurtes produzidos demonstram que os iogurtes são boas fontes de Ca (94,97 a 112,66 mg/100 mL), K (94,1 a 137 mg/100 mL) e Na (84,7 a 85,2 mg/100 mL), e fontes razoáveis de Mg (19,3 a 23,1 mg/100 mL).

A concentração de Ca em alimentos destinados a idosos revela-se como crucial pelos seus benefícios já relatados em estudos anteriores que, comprovaram que a densidade mineral óssea aumenta significativamente pelo consumo de alimentos com dose diária de cálcio relevante. Outros estudos revelaram ainda que mulheres saudáveis na pós-menopausa com ingestão adequada de cálcio podem aumentar a densidade mineral óssea da anca após um ano de suplementação.²⁵⁴

Estudos anteriores revelaram alterações do metabolismo do Mg com o envelhecimento, incluindo a diminuição da sua ingestão, déficit na absorção intestinal e perda renal deste mineral. O consumo reduzido de alimentos que contenham Mg leva ao déficit deste mineral no organismo sendo muitas vezes assintomático. Distúrbios do sono e distúrbios cognitivos são comuns em idosos com déficit leve de Mg e podem ser frequentemente confundidos com sintomas catalogados para essas idades.²⁵⁵

Os déficits crônicos de Mg aumentam a produção de radicais livres que têm sido implicados no desenvolvimento de vários distúrbios crônicos, incluindo doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, asma, depressão, distúrbios psiquiátricos, doença de Alzheimer (DA) e outras síndromes demenciais, doenças musculares (dor muscular, fadiga crônica e fibromialgia), fragilidade óssea e cancro.²⁵⁶

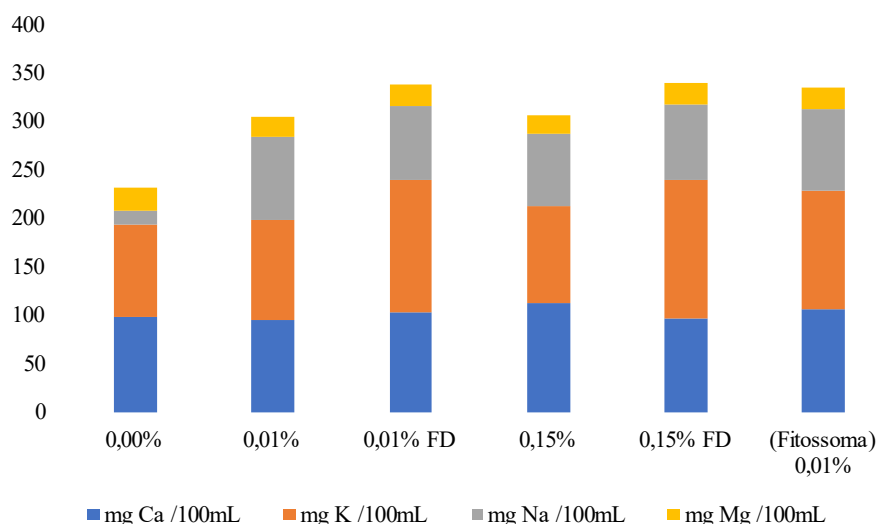


Figura 4. 11 - Concentração (mg/100mL) de minerais Cálcio (Ca), Fósforo (K), Magnésio (mg) e Sódio (Na)

Com o aumento da percentagem de fração F4 notou-se ainda um acréscimo da concentração de sal no iogurte passando de 0,14 g/100 mL no iogurte de controlo para uma média de 0,18 g/100 mL. Este valor deverá estar associado ao ambiente salino de onde provém a alga utilizada para a extração do extrato empregue na produção dos iogurtes.

Segundo o Decreto de Lei 54/2010, de 28 de maio, a quantidade a ter em consideração para decidir, num alimento, o que constitui uma quantidade significativa para a dose diária de consumo recomendada (DDR), deverá corresponder a 15 % da dose diária recomendada.²⁵⁷

Os iogurtes contendo extrato F4 ou fitossoma apresentaram em média, para a DDR relativamente baixas: 3,98 (Na), 6,06 (K), 5,76 (Mg) e 0,003 (Sal), enquanto o valor de cálcio se aproximou bastante da quantidade significativa, com 12,85 % DDR.

Importante referir que comparando a % DDR de sal, onde iogurtes comercializados apresentam valores médios de 2, os iogurtes produzidos apresentaram um valor consideravelmente mais baixo, tornando-se benéfico para a saúde do idoso.

Estudos anteriores reportaram para diferentes iogurtes valores de % DDR de 7 para K, bastante próximos do obtido no presente estudo (6,06) e 3 para Mg, relativamente inferior ao obtido (5,76), possivelmente devido à integração do extrato de algas conhecidas por serem uma rica fonte de proteínas e minerais (cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), iodo (I), sódio (Na), fósforo (P), níquel (Ni), cromo (Cr), selênio (Se), ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn)).

258

O Na é considerado um regulador essencial da pressão arterial, com ingestões mais altas correlacionadas com pressão arterial elevada e ingestões reduzidas com pressão arterial

excessivamente baixa. A ingestão baixa ou excessiva deste mineral poderá estar associada a maiores taxas de mortalidade.²⁵⁹

Por outro lado, o K, além de ser um nutriente fisiologicamente essencial ao ser humano, foi identificado como uma alternativa saudável ao consumo de Na. A sua coexistência é essencial para prevenir efeitos adversos à saúde, onde a alta proporção de Na para baixo K pode ser um fator crítico de risco de hipertensão. De salientar ainda que, ensaios clínicos confirmam a capacidade de reduzir a ingestão de Na e o uso de suplementos de K podem reduzir a pressão arterial sem efeitos colaterais prejudiciais.²⁶⁰

A análise de Na e K permite o cálculo da relação Na/K, e segundo estudos anteriores há uma redução do risco de doenças cardiovasculares se obtida uma relação Na/K < 1,0, demonstrando-se como bastante relevante a análise desta na dieta humana.²⁶¹

Os iogurtes apresentaram na generalidade valores abaixo de 1, variando entre ,0,16 no iogurte de controlo até 0,81 em iogurtes contendo extrato F4.

4.2.7 Proteínas e Açúcares totais

O teor de proteína é conhecido por ser tendencialmente superior em algas verdes e vermelhas com valores entre os 10-47%.¹²⁷ Com base nos valores de proteína de algas verdes de estudos anteriores pode-se atribuir o aumento proteico nos iogurtes fortificados ao aumento da percentagem de extrato, conforme Tabela 4.2, podendo ainda concluir-se que o nanoencapsulamento aumenta a concentração de proteínas do extrato protegendo-a de possíveis fatores de deterioração que ocorram durante as etapas de fermentação ou armazenamento. Comparativamente com os iogurtes comercializados, os iogurtes contendo extrato F4 e fitossomas ultrapassam o valor de proteína de 3,30, alcançando-se valores de 4,40 g/100g em iogurtes contendo 0,15% de extrato F4, e chegando às 4,45 g/100g nos iogurtes onde foram incluídos os fitossomas.

O teor de açúcar total apresentou uma ligeira redução, comparativamente com o iogurte de controlo com o aumento da percentagem de extrato F4, notando-se uma redução acentuada face a iogurtes comercializados, no entanto, o nanoncapsulamento mostrou-se também uma boa opção para contrariar este efeito, ao reduzir o aumento da acidez, reduziu o consumo da lactose, permitindo que o iogurte apresentasse um valor de açúcares totais bem mais semelhante aos comercializados, conforme a Tabela 4.2.

Ressalva-se que a tendência de redução do valor de açúcares nos iogurtes de controlo e contendo extrato F4 deverá estar ligado ao já referido, na secção 4.4, aumento da acidez ao

sétimo dia mais acentuado nestes iogurtes, que deverá estar na origem do consumo da lactose e produção de ácido láctico.

Tabela 4. 2 - Valores de Açúcares Totais e Lípidos Totais, Proteínas e Valor energético das amostras de iogurtes produzidos

Leite	% de extrato <i>Codium tomentosum</i>	Valor energético Kcal/g	
		Açúcares	Proteína
Meio Gordo	0	2,101	3,174
	0,01%	1,507	3,539
	0,01% FD	1,271	3,751
	0,15%	1,373	4,277
	0,15% FD	2,139	4,398
	(Fitossoma) 0,01%	3,004	4,454
Iogurte Meio gordo		4,30	3,30

4.2.8 Valor energético

A nível calórico tendo em conta que a dose de referência para um adulto médio é de 2000Kcal, notou-se uma discrepância de valores na % DR, entre o iogurte de controlo e os contendo 0,01% de extrato, com valores entre 1,42 a 1,53, face ao iogurte comercializado, que identifica no rótulo valores de 3%. No entanto, os iogurtes produzidos contendo 0,15% de extrato F4 encontram se perto deste valor, chegando aos 2,15%, ultrapassando-o no caso dos contendo fitossomas, com 3,90% (Fig. 4.3).

Tabela 4. 3 - Valores de Energia (Kcal/g) e % Dose recomendada para um adulto médio das amostras de iogurtes produzidos

Leite	% de extrato <i>Codium Tomentosum</i>	Valor energético Kcal/g	% Dose recomendada
Meio Gordo	0	30,59	1,53
	0,01%	27,33	1,37
	0,01% FD	28,38	1,42
	0,15%	36,00	1,80
	0,15% FD	43,19	2,15
	(Fitossoma) 0,01%	78,01	3,90
Iogurte Meio gordo		56,50	3

4.3 Avaliação sensorial

A análise sensorial efetuada seguiu o método efetivo no qual os provadores se pronunciaram sobre o seu gosto pessoal em relação aos iogurtes preparados. Nesta análise

participaram 5 provadores consumidores de iogurte naturais. A análise permitiu avaliar o aspeto visual, aroma e paladar dos iogurtes produzidos de forma a selecionar as misturas mais agradáveis.

As opiniões foram bastante coerentes, iogurtes com percentagens de fração F4 acima dos 0,01% apresentaram uma tonalidade amarelada e pouco apelativa, também verificado em estudos anteriores de adição de extratos de algas marinhas a iogurtes ²⁶². Além disso, os resíduos da fração F4 no fundo do iogurte inviabilizariam a compra do mesmo (Figura 4.12). A adição da fruta desidratada ajudou neste aspeto, não permitindo detetar se o resíduo se tratava da mesma ou da fração F4 (Figura 4.13). Por outro lado, a adição desta quantidade de extrato integrados em fitossomas solucionou este aspeto, no entanto verificou-se que a adição de percentagens superiores, o resultado não foi o esperado (Figura 4.14), sendo que os fitossomas se aglomeraram na base do recipiente.

O sabor dos iogurtes a partir dos 0,10% de F4 tornou-se mais ácido fazendo com que os provadores se questionassem quanto à viabilidade de consumir o mesmo até ao final. Neste caso, a adição de fruta aos iogurtes ajudou a melhorar o sabor, mas não o solucionou por completo.

E por fim, em relação ao aroma o mesmo não foi afetado pela inclusão da fração F4 ou fitossomas, mantendo-se a opinião do aroma a “iogurte natural comprado no minimercado”.



Figura 4. 12 - Iogurtes fabricados com 0,005% [1], 0,01% [2], 0,05% [3], 0,10% [4] e 0,2% [5] de extrato *Codium tomentosum*



Figura 4. 13 - Iogurtes fabricados com 0,01% de extrato com [6] e sem [2] fruta desidratada e com 0,15% de extrato com fruta desidratada [7]



Figura 4. 14 - Iogurtes fabricados com 0,01% [8] e 0,15% [9] de extrato em fitossomas e 0,15% de extrato [10]

5. Considerações finais e trabalho futuro

A implementação de comportamentos promotores da saúde, incluindo hábitos alimentares equilibrados, pode estar associada ao envelhecimento saudável e ao aumento da longevidade, bem como à diminuição do risco de declínio cognitivo.

O presente estudo teve por objetivo a produção e caracterização de fitossomas contendo uma fração de um extrato de *Codium tomentosum*, do qual já tinha sido confirmado o poder neuroprotetor em estudo anterior desenvolvido no GRAQ. Posteriormente, foram produzidos iogurtes nos quais foi introduzida a fração F4 ou os fitossomas, caracterizando-se físico-química e sensorialmente de modo a poder-se avaliar a viabilidade da inclusão deste alimento como um hábito alimentar para a geração mais envelhecida.

Os fitossomas produzidos confirmaram que têm melhor lipofilicidade e hidrofiliabilidade do que os constituintes ativos. A fração F4 apresentou elevada solubilidade aquosa (95%), enquanto a solubilidade em n-octanol foi bastante reduzida (5%). A solubilidade aquosa do fitossoma sofreu um decréscimo não muito acentuado em comparação com o extrato, mas apresentou uma melhoria significativa na solubilidade em n-octanol.

O pico de absorção UV característico de absorção da fração F4 de *Codium tomentosum* (280 nm) manteve-se presente no do fitossoma sugerindo que ocorreram interações físicas fracas entre o extrato e a L- α -fosfatidilcolina durante a formação do complexo, e assim concluiu-se que os cromóforos dos compostos não são afetados por serem complexados com fosfolípidos.

O comportamento de fusão DSC sugeriu que o processo de formulação dispersou completamente a fração F4 dentro da matriz fosfolipídica, levando à formação do complexo fitossômico amorfo e estável.

A possível interação entre a fração F4 de *Codium tomentosum* e a L- α -fosfatidilcolina no fitossoma foi também estudada por FTIR e os espectros obtidos confirmaram, mais uma vez, a ligação química entre os compostos da fração F4 de *Codium tomentosum* e a L- α -fosfatidilcolina.

Após caracterização dos fitossomas, foram desenvolvidos diferentes tipos de iogurtes e avaliados os seus parâmetros físico-químicos bem como o seu efeito neuroprotetor.

A inclusão da fração F4 de *Codium tomentosum* ou fitossomas não alteraram significativamente os valores de pH entre amostras nos primeiros dias de armazenamento. Entretanto, com o aumento do tempo de armazenamento, observou-se que os valores de pH diminuíram ligeiramente entre o quarto e sétimo dia em todas as formulações de iogurtes.

Notou-se, no entanto, um menor rácio da redução do pH em amostras que continham extrato ou fitossomas. À semelhança do que ocorreu ao valor de pH a adição da fração F4, ou fruta desidratada não afetou significativamente os níveis de acidez do iogurte quando comparados com os de controlo. As amostras encapsuladas foram mais estáveis durante o armazenamento.

Com o acréscimo da percentagem de fração F4 incluído no iogurte a sinérese aumentou, embora a percentagem de humidade se tenha mantido. Aparentemente não terá ocorrido a correta ligação entre o leite e o extrato durante a fermentação, ou a dissolução do extrato no leite.

Ao quarto dia tanto os iogurtes isentos, ou contendo F4 ou fitossomas não apresentaram valor de peróxido, enquanto, ao sétimo dia este valor aumentou consideravelmente para os iogurtes que integraram 0,01% e 0,15% de extrato. O iogurte contendo fitossomas apresentou valor de peróxidos bastante inferior em comparação aos restantes iogurtes que integraram extrato. No caso dos iogurtes integrando a fração F4 de *Codium tomentosum*, com o aumento da percentagem de lípidos, aumentaram também os peróxidos lipídicos.

Notou-se um aumento de proteína no iogurte com o aumento da percentagem de fração F4 concluindo-se, no entanto, que o nanoencapsulamento aumenta a concentração de proteínas do extrato.

O teor de açúcar foi bastante afetado pela adição da fração F4, no entanto, o nanoencapsulamento mostrou-se também uma boa opção para contrariar este efeito, principalmente em comparação ao iogurte comercializado.

O teor de cinzas aumentou com o aumento da percentagem de fração F4 introduzida nos iogurtes, até um máximo de 7,82% em comparação com o iogurte de controlo, com um valor de 5,20%.

Com o aumento da percentagem de fração F4 notou-se ainda um acréscimo da concentração de sal no iogurte passando de 0,14g/100mL no iogurte de controlo para uma média de 0,18g/100mL.

Relativamente ao efeito neuroprotetor, ainda que as percentagens de inibição das enzimas AChE e BuchE obtidas tenham sido relativamente baixas devido aos iogurtes fabricados integrarem percentagens bastante baixas da fração F4 ou fitossomas, sabe-se que a fração F4 apresenta elevada percentagem de inibição das colinesterases (Figura 4.6) e, portanto, por efeito cumulativo a possibilidade de se alcançar inibição pelo consumo destes iogurtes não deve ser descartada.

Sensorialmente, iogurtes com percentagens de fração F4 acima dos 0,01% apresentaram uma tonalidade amarelada e pouco apelativa e os resíduos de F4 depositaram-se no fundo do

frasco de preparação do mesmo. A adição da fruta desidratada ajudou neste aspeto, por outro lado a adição desta quantidade de fração F4 em fitossomas também funcionou. No entanto para percentagens superiores o resultado não foi o esperado, sendo que os fitossomas se aglomeraram na base do recipiente.

O sabor dos iogurtes a partir dos 0,10% de fração F4 tornou-se mais ácido fazendo com que os provadores se questionassem quanto à viabilidade do seu consumo. Neste caso, a adição de fruta aos iogurtes ajudou, mas não o solucionou por completo.

E por fim, em relação ao aroma o mesmo não foi afetado pela inclusão da fração F4 ou fitossomas, mantendo-se a opinião do aroma a “iogurte natural comprado no minimercado”.

Assim, podemos concluir que a nanoencapsulação é uma alternativa favorável para preservar e proteger compostos bioativos contra circunstâncias ambientais inadequadas e aumentar a sua biodisponibilidade e estabilidade, favorecendo a sua aplicação em alimentos. Além disso, o encapsulamento diminui a volatilidade e aumenta a estabilidade química e térmica; protege contra oxigénio, pH, humidade e digestão gástrica; mascara sabor e aroma desagradáveis; melhora a solubilidade de compostos lipofílicos em meio aquoso; e possibilita a absorção prolongada de nutrientes. Todas essas vantagens são possibilitadas pela redução do tamanho das nanopartículas.

Futuramente, deveria ser analisado o poder antioxidante destes alimentos assim como aumentar consideravelmente o número e faixa etária dos indivíduos envolvidos na análise sensorial.

Bibliografia

1. Envelhecimento - Nações Unidas - ONU Portugal. <https://unric.org/pt/envelhecimento/>.
2. A Doença de Alzheimer - Associação Alzheimer Portugal. <https://alzheimerportugal.org/a-doenca-de-alzheimer/>.
3. Brijesh K. Tiwari & Declan J. Tróia. Seaweed sustainability—food and nonfood applications. *Elsevier* doi:978-0-12-418697-2.00001-5.
4. Biris-Dorhoi, E. S. *et al.* Macroalgae—A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients* **12**, 1–23 (2020).
5. Wilkinson, S. B. T., Pidgeon, N., Lee, J., Pattison, C. & Lambert, N. Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods Exploring Consumer Attitudes Towards Functional Foods. (2016) doi:10.1300/J133v04n03_02.
6. Gibson, G. R. & Williams, C. M. *Functional foods : concept to product*. (CRC Press, 2000).
7. Monteiro, P. J. O alimento funcional como recurso terapêutico: percepções e desafios sociais. (2018).
8. Hasler, C. M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition* **132**, 3772–3781 (2002).
9. Hasler, C. M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition* **132**, 3772–3781 (2002).
10. Crowe, K. M. & Francis, C. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. *J Acad Nutr Diet* **113**, 1096–1103 (2013).
11. Grochowicz, J., Fabisiak, A. & Ekielski, A. Importance of physical and functional properties of foods targeted to seniors. *Journal of Future Foods* **1**, 146–155 (2021).
12. Duarte, G. & Reis, B. *Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos: ciência, avaliação e consumo*. (2019).
13. Rodrigues, D. B. *et al.* Trust your gut: Bioavailability and bioaccessibility of dietary compounds. *Current Research in Food Science* **5**, 228–233 (2022).
14. Matsumoto, K. *et al.* The Effects of a Probiotic Milk Product Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the Defecation Frequency and the Intestinal Microflora of Sub-optimal Health State Volunteers: A Randomized Placebo-controlled Cross-over Study. *Bioscience and Microflora* **25**, 39–48 (2006).
15. Bao, C. *et al.* The delivery of sensitive food bioactive ingredients: Absorption mechanisms, influencing factors, encapsulation techniques and evaluation models. *Food Research International* **120**, 130–140 (2019).
16. Guyonnet, D., Schlumberger, A., Mhamdi, L., Jakob, S. & Chassany, O. Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 improves gastrointestinal well-being and

- digestive symptoms in women reporting minor digestive symptoms: a randomised, double-blind, parallel, controlled study. *Br J Nutr* **102**, 1654–1662 (2009).
17. Buriti, F. C. A. & Saad, S. M. I. Chilled milk-based desserts as emerging probiotic and prebiotic products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 139–150 (2014).
 18. Upritchard, J. E., Zeelenberg, M. J., Huizinga, H., Verschuren, P. M. & Trautwein, E. A. Modern fat technology: what is the potential for heart health? *Proc Nutr Soc* **64**, 379–386 (2005).
 19. Redgwell, R. J. & Fischer, M. Dietary fiber as a versatile food component: An industrial perspective. *Molecular Nutrition and Food Research* **49**, 521–535 (2005).
 20. Putet, G. *et al.* Discussion Following the presentation on ‘Human Milk Fortification.’ *Nestle Nutrition Workshop Series: Pediatric Program* **59**, 209–211 (2007).
 21. Martí, N., Mena, P., Cánovas, J. A., Micol, V. & Saura, D. Vitamin C and the Role of Citrus Juices as Functional Food: **4**, 677–700 (2009).
 22. Shiby, V. K. & Mishra, H. N. Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods—A Review. **53**, 482–496 (2013).
 23. Goldberg, E. M. *et al.* Designer laying hen diets to improve egg fatty acid profile and maintain sensory quality. *Food Science & Nutrition* **1**, 324–335 (2013).
 24. Özen, A., Bibiloni, M. del M., Pons, A., hospitalaria, J. T.-N. & 2014, undefined. Consumption of functional foods in Europe; a systematic review. *redalyc.org* **29**, 470–478 (2014).
 25. Ozen, A., Pons, A., reviews, J. T.-N. & 2012, undefined. *Worldwide consumption of functional foods: a systematic review*. vol. 70 <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-abstract/70/8/472/1854193> (2012).
 26. Granato, D. *et al.* Annual Review of Food Science and Technology Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. (2020) doi:10.1146/annurev-food-032519.
 27. Martins, F., Pinho, O. & Ferreira, I. Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação. (2004).
 28. Schrezenmeir, J. & de Vrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 361s–364s (2001).
 29. Markowiak, P. & Ślizewska, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 2017, Vol. 9, Page 1021 **9**, 1021 (2017).
 30. Raizel, R., Santini, E., Kopper, A. M. & Filho, A. D. dos R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Ciência & Saúde* **4**, 66–74 (2011).
 31. Tan, F. H. P. *et al.* Lactobacillus probiotics improved the gut microbiota profile of a *Drosophila melanogaster* Alzheimer’s disease model and alleviated neurodegeneration in the eye. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0086> **11**, 79–89 (2020).

32. Hort, J., Valis, M. & Angelucci, F. Administration of pre/probiotics with conventional drug treatment in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research* **15**, 448–449 (2020).
33. Collins, J. K., Thornton, G. & Sullivan, G. O. Selection of Probiotic Strains for Human Applications. *International Dairy Journal* **8**, 487–490 (1998).
34. Susan Sungsoo Cho, E. T. F. Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients. *Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients* (2009)
doi:10.1201/9781420062151/HANDBOOK-PREBIOTICS-PROBIOTICS-INGREDIENTS-SUSAN-SUNGSOO-CHO-TERRY-FINOCCHIARO.
35. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. & Mattila-Sandholm, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* **84**, 197–215 (2000).
36. Rodríguez-Cerezo, Emilio. & Stein, A. J. Functional food in the European Union. *Scientific and Technical Reports* (2008).
37. Weiss, G. A. & Hennet, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2959–2977 (2017).
38. Kadooka, Y. *et al.* Effect of Lactobacillus gasseri SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br J Nutr* **110**, 1696–1703 (2013).
39. Sharafedinov, K. K. *et al.* Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients--a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutr J* **12**, (2013).
40. Ejtahed, H. S. *et al.* Effect of probiotic yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Dairy Sci* **94**, 3288–3294 (2011).
41. Hariri, M. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial on probiotic soy milk and soy milk: effects on epigenetics and oxidative stress in patients with type II diabetes. *Genes Nutr* **10**, 1–8 (2015).
42. Liu, Z. *et al.* Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 50–63 (2011).
43. Chitapanarux, I. *et al.* Randomized controlled trial of live lactobacillus acidophilus plus bifidobacterium bifidum in prophylaxis of diarrhea during radiotherapy in cervical cancer patients. *Radiat Oncol* **5**, (2010).
44. Effects of Probiotics on Peripheral Immunity in Parkinson's Disease - Tabular View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT05173701?view=record>.
45. Effect of Probiotics in Alzheimer's Disease - Tabular View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT05145881>.
46. Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**, 1401–1412 (1995).

47. Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. van, Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* **17**, 259–275 (2004).
48. Sarmiento, F., Bernaud, R. & Rodrigues, T. C. Fibra alimentar-Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo Dietary fiber-Adequate intake and effects on metabolism health. *Arq Bras Endocrinol Metab* **57**, (2013).
49. Wang, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International* **42**, 8–12 (2009).
50. Macfarlane, G. T., Steed, H. & Macfarlane, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol* **104**, 305–344 (2008).
51. Parnell, J. A. & Reimer, R. A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* **89**, 1751–1759 (2009).
52. Azcarate-Peril, M. A. *et al.* Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E367–E375 (2017).
53. Munjal, U., Gleib, M., Pool-Zobel, B. L. & Scharlau, D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br J Nutr* **102**, 663–671 (2009).
54. Prebiotics in the Parkinson's Disease Microbiome - Tabular View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT04512599>.
55. Scavuzzi, B. M., Henrique, F. C., Miglioranza, L. H., Simão, A. & Dichi, I. Impact of Prebiotics, Probiotics and Synbiotics on Components of the Metabolic Syndrome. *Ann Nutr Disord & Ther* **1**, (2014).
56. Pandey, K. R., Naik, S. R. & Vakil, B. v. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* **52**, 7577–7587 (2015).
57. Sanchez, M. *et al.* Effect of Lactobacillus rhamnosus CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *Br J Nutr* **111**, 1507–1519 (2014).
58. Mozaffarian, D. & Wu, J. H. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events. *J Am Coll Cardiol* **58**, (2011).
59. Cannon, D. From Fish Oil to Microalgae Oil ... A Win-Win Shift for Humans and Our Habitat. *EXPLORE* **5**, 299–303 (2009).
60. van Beelen, V. A. *et al.* An n-3 PUFA-rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats. *Food Chem Toxicol* **47**, 316–320 (2009).
61. Dinicolantonio, J. J. & O'keefe, J. H. The Importance of Marine Omega-3s for Brain Development and the Prevention and Treatment of Behavior, Mood, and Other Brain Disorders. *Nutrients* **12**, 1–15 (2020).

62. Calder, P. C. n–3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical Science* **107**, 1–11 (2004).
63. Moyad, M. A. An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part II. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **23**, 36–48 (2005).
64. Guschina, I. A. & Harwood, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* **45**, 160–186 (2006).
65. Moraes, F. P. & Colla, L. M. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. *Revista Eletrônica de Farmácia* **3**, 109–122 (2006).
66. Flora, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 191–206 (2009).
67. Kocot, J., Luchowska-Kocot, D., Kiełczykowska, M., Musik, I. & Kurzepa, J. Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders? *Nutrients* **9**, (2017).
68. Icer, M. A., Arslan, N. & Gezmen-Karadag, M. Effects of vitamin E on neurodegenerative diseases: an update. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **81**, 21–33 (2021).
69. Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C. & Pogson, B. J. Carotenoid metabolism in plants. *Mol Plant* **8**, 68–82 (2015).
70. Cho, K. S., Shin, M., Kim, S. & Lee, S. B. Recent Advances in Studies on the Therapeutic Potential of Dietary Carotenoids in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, (2018).
71. Lemes, A. C. *et al.* Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. *SciELO Brasil* **5**, 741–750 (2012).
72. Montonen, J., Knekt, P., Järvinen, R., Aromaa, A. & Reunanen, A. Whole-grain and fiber intake and the incidence of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* **77**, 622–629 (2003).
73. Whelton, S. P. *et al.* Effect of dietary fiber intake on blood pressure: A meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *Journal of Hypertension* **23**, 475–481 (2005).
74. Steffen, L. M. *et al.* Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* **78**, 383–390 (2003).
75. Liu, S. *et al.* Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **70**, 412–419 (1999).
76. Hauner, H. *et al.* Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Carbohydrate Intake and Prevention of Nutrition-Related Diseases. *Annals of Nutrition and Metabolism* **60**, 1–58 (2012).
77. Borneo, R. & Aguirre, A. Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. *LWT - Food Science and Technology* **41**, 1748–1751 (2008).

78. Tunglund, B. C. & Meyer, D. Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **1**, 90–109 (2002).
79. Ramírez-Salazar, S. A., Herren, C., McCartney, J. & Ortiz García, J. G. Dietary Insights in Neurological Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **21**, 1–11 (2021).
80. Tsao, R. & Yang, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1018**, 29–40 (2003).
81. Angelo, P. M. & Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* **66**, 1–9 (2007).
82. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25–30 (1995).
83. Liu, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci* **78 Suppl 1**, (2013).
84. Arruda, H. S., Neri-Numa, I. A., Kido, L. A., Maróstica Júnior, M. R. & Pastore, G. M. Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. *Journal of Functional Foods* **75**, 104203 (2020).
85. Edvardsen, B. & Medlin, L. K. Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. (2007) doi:10.1201/9780849379901.ch10.
86. Ariede, M., Candido, T. & Jacome, A. Cosmetic attributes of algae-A review.
87. Škrovánková, S. Seaweed vitamins as nutraceuticals. *Adv Food Nutr Res* **64**, 357–369 (2011).
88. Leandro, A., Pereira, L. & Gonçalves, A. M. M. Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Marine Drugs* **18**, (2020).
89. Kazir, M. *et al.* Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocolloids* **87**, 194–203 (2019).
90. Wells, M. L. *et al.* Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol* **29**, 949–982 (2017).
91. Holdt, S. L. & Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* **23**, 543–597 (2011).
92. Mæhre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K. E. & Elvevoll, E. O. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *J Sci Food Agric* **94**, 3281–3290 (2014).
93. Biancarosa, I. *et al.* Chemical characterization of 21 species of marine macroalgae common in Norwegian waters: benefits of and limitations to their potential use in food and feed. *J Sci Food Agric* **98**, 2035–2042 (2018).

94. nutrition, P. C.-T. A. journal of clinical & 2006, undefined. n- 3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *academic.oup.com*.
95. Nobre, M. E. P. *et al.* Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. *Nutrition Research* **33**, 422–433 (2013).
96. Praveen, M. A., Parvathy, K. R. K., Balasubramanian, P. & Jayabalan, R. An overview of extraction and purification techniques of seaweed dietary fibers for immunomodulation on gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology* **92**, 46–64 (2019).
97. Murray, M., Dordevic, A. L., Ryan, L. & Bonham, M. P. An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: Marine algal polyphenols. *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**, 1342–1358 (2018).
98. Senthilkumar, P. & Sudha, S. Antioxidant and antibacterial properties of methanolic extract of green seaweed *Chaetomorpha linum* from Gulf of Mannar: Southeast coast of India. *Jundishapur J Microbiol* **5**, 411–416 (2012).
99. Cotas, J. *et al.* Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications. *Mar Drugs* **18**, (2020).
100. Roohinejad, S. *et al.* Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Research International* **99**, 1066–1083 (2017).
101. Ferreira Patarra, R., Paiva, L., Isabel Neto, A., Lima, E. & Baptista, J. Nutritional value of selected macroalgae. doi:10.1007/s10811-010-9556-0.
102. Aguilera-Morales, M., Casas-Valdez, M., Carrillo-Domínguez, S., González-Acosta, B. & Pérez-Gil, F. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**, 79–88 (2005).
103. Algae - Algae And Their Characteristics, Types Of Algae, Ecological Relationships, Factors Limiting The Productivity Of Algae - Species, Brown, Green, and Pigments - JRank Articles. <https://science.jrank.org/pages/205/Algae.html>.
104. Souza, R. B. *et al.* Neuroprotective Effects of Sulphated Agar from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **120**, 159–170 (2017).
105. Fleurence, J. & Levine, I. *Seaweed in health and disease prevention*. (2016).
106. Lordan, S., Ross, R. P. & Stanton, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar Drugs* **9**, 1056–1100 (2011).
107. Martins, B., Vieira, M., Delerue-Matos, C., Grosso, C. & Soares, C. marine drugs Review Biological Potential, Gastrointestinal Digestion, Absorption, and Bioavailability of Algae-Derived Compounds with Neuroprotective Activity: A Comprehensive Review. (2022) doi:10.3390/md20060362.

108. Barbosa, M. & Andrade, P. B. marine drugs Bioactive Compounds from Macroalgae in the New Millennium: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Mar. Drugs* **12**, 4934–4972 (2014).
109. Kang, S. M. *et al.* Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **34**, 96–105 (2012).
110. Kannan, R. R. R., Aderogba, M. A., Ndhlala, A. R., Stirk, W. A. & van Staden, J. Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Research International* **54**, 1250–1254 (2013).
111. Yoon, N. Y., Lee, S. H., Yong-Li & Kim, S. K. Phlorotannins from *Ishige okamurae* and their acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory effects. *Journal of Functional Foods* **1**, 331–335 (2009).
112. Heo, S.-J. *et al.* Neuroprotective Effect of Phlorotannin Isolated from *Ishige okamurae* Against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Murine Hippocampal Neuronal Cells, HT22. *Appl Biochem Biotechnol* **166**, 1520–1532 (2012).
113. Heo, S.-J. *et al.* Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. doi:10.1007/s00217-008-0918-7.
114. Andrade, P. B. *et al.* Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry* **138**, 1819–1828 (2013).
115. Ren, Y., Houghton, P. & Hider, R. C. Relevant activities of extracts and constituents of animals used in traditional Chinese medicine for central nervous system effects associated with Alzheimer's disease. *JPP* **58** (2006) doi:10.1211/jpp.58.7.0015.
116. el Gamal, A. A. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* **18**, 1–25 (2010).
117. Pangestuti, R. & Kim, S. K. Neuroprotective effects of marine algae. *Mar Drugs* **9**, 803–818 (2011).
118. Silva, J. *et al.* Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's Disease Model. *Mar Drugs* **17**, (2019).
119. Barbalace, M. C. *et al.* Anti-Inflammatory Activities of Marine Algae in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, (2019).
120. da Costa, E. *et al.* Decoding bioactive polar lipid profile of the macroalgae *Codium tomentosum* from a sustainable IMTA system using a lipidomic approach. (2015) doi:10.1016/j.j.algal.2015.09.020.
121. Silva, J. *et al.* Natural Approaches for Neurological Disorders—The Neuroprotective Potential of *Codium tomentosum*. *Molecules* **25**, (2020).
122. Silva, J. *et al.* Loliolide, a New Therapeutic Option for Neurological Diseases? In Vitro Neuroprotective and Anti-Inflammatory Activities of a Monoterpenoid Lactone Isolated from *Codium tomentosum*. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, Vol. 22, Page 1888 **22**, 1888 (2021).

123. Blum, D. *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* **65**, 135–172 (2001).
124. Soares, C. *et al.* Multi-step subcritical water extracts of fucus vesiculosus L. And codium tomentosum stackhouse: Composition, health-benefits and safety. *Processes* **9**, 893 (2021).
125. Rodrigues, D. *et al.* Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chem* **183**, 197–207 (2015).
126. Leonel Pereira. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Nova Science Publishers, Inc.* (2011).
127. Peñalver, R. *et al.* Seaweeds as a functional ingredient for a healthy diet. *mdpi.com* **18**, (2020).
128. Ito, K. & Hori, K. Seaweed: Chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International* **5**, 101–144 (1989).
129. Dembitsky, V. M., Řezanková, H., Řezanka, T. & Hanuš, L. O. Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus Codium. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**, 1125–1145 (2003).
130. Andrade, P. B. *et al.* Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry* **138**, 1819–1828 (2013).
131. Andrade, P. B. *et al.* Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry* **138**, 1819–1828 (2013).
132. Höglund, K. & Salter, H. Molecular biomarkers of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Diagn* **13**, 845–861 (2013).
133. Rodolfo, C., Campello, S. & Cecconi, F. Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International* **117**, 156–166 (2018).
134. Tarozzi, A. *et al.* Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, (2013).
135. Soares, C. *et al.* Multi-Step Subcritical Water Extracts of Fucus vesiculosus L. and Codium tomentosum Stackhouse: Composition, Health-Benefits and Safety. *Processes* **2021**, Vol. 9, Page 893 **9**, 893 (2021).
136. Vasto, S. *et al.* Inflammation, ageing and cancer. *Mechanisms of Ageing and Development* **130**, 40–45 (2009).
137. Manandhar, B. *et al.* Phlorotannins with Potential Anti-tyrosinase and Antioxidant Activity Isolated from the Marine Seaweed Ecklonia stolonifera. *Antioxidants (Basel)* **8**, (2019).
138. Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O. & Okoh, A. I. Macroalgae as a Valuable Source of Naturally Occurring Bioactive Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mar Drugs* **17**, (2019).

139. Sindhi, V. *et al.* Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research* **7**, 828–835 (2013).
140. Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. Â. & Vicente, A. A. Nanotecnologia como ferramenta para produzir novos alimentos funcionais: vantagens e precauções.
141. Bazana, M. T., Codevilla, C. F. & de Menezes, C. R. Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives. *Current Opinion in Food Science* **26**, 47–56 (2019).
142. Sandhir, R., Yadav, A., Sunkaria, A. & Singhal, N. Nano-antioxidants: An emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions. *Neurochemistry International* **89**, 209–226 (2015).
143. Neethirajan, S. & Jayas, D. S. Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. *Food and Bioprocess Technology* **4**, 39–47 (2011).
144. Bajpai, V. K. *et al.* Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis* **26**, 1201–1214 (2018).
145. Silva, H. D., Cerqueira, M. Â. & Vicente, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology* **5**, 854–867 (2012).
146. Arancibia, C., Riquelme, N., Zúñiga, R. & Matiacevich, S. Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **44**, 159–166 (2017).
147. Kesarwani, K. & Gupta, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **3**, 253–266 (2013).
148. Chaudhry, Q., Watkins, R. & Castle, L. Nanotechnologies in food: What, why and how? 1–19 (2017).
149. Weiss, J., Takhistov, P., science, D. M.-J. of food & 2006, undefined. Functional materials in food nanotechnology. *academia.edu*.
150. Acosta, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **14**, 3–15 (2009).
151. Silva, H. D., Cerqueira, M. Â. & Vicente, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology* **5**, 854–867 (2012).
152. Stability Testing of Nutraceuticals and Functional Foods. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* 523–538 (2020) doi:10.1201/9781420036695-36.
153. Rezaei, A., Fathi, M. & Jafari, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. *Food Hydrocolloids* **88**, 146–162 (2019).
154. Pisoschi, A. M. *et al.* Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. *European Journal of Medicinal Chemistry* **157**, 1326–1345 (2018).

155. Neves, M. T. *et al.* Use of liposome technology in the encapsulation of bioactive compounds – Review. *The Journal of Engineering and Exact Sciences* **7**, 13295-01–20e (2021).
156. Joye, I. J. *et al.* A comprehensive perspective of food nanomaterials. *Advances in Food and Nutrition Research* **88**, 1–45 (2019).
157. Uchechi, O., Ogbonna, J. D. N. & Attama, A. A. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* (2014) doi:10.5772/58672.
158. Singh, S. K. & Jambheshwar, G. Nanoparticle vesicular systems: A versatile tool for drug delivery. (2010).
159. Peter Walde, S. I. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Elsevier* vol. 18 143–177 (2001).
160. Andronescu, E. & Mihai Grumezescu, A. Nanostructures for Oral Medicine. (2017).
161. Andreia Isabel Barradas Correia. NANOVEICULAÇÃO DE POLIFENÓIS. (2014).
162. Martins, S., Sarmiento, B., Ferreira, D. C. & Souto, E. B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **2**, 595 (2007).
163. Videira, R. A., Antunes-Madeira, M. C. & Madeira, V. M. C. Ethylazinos Interaction with Membrane Lipid Organization Induces Increase of Proton Permeability and Impairment of Mitochondrial Bioenergetic Functions. *Toxicology and Applied Pharmacology* **175**, 209–216 (2001).
164. Ângelo, M. & Ribeiro, F. Desenvolvimento de uma nanoformulação de compostos naturais para o tratamento de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento. (2018).
165. Lu, M. *et al.* Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **14**, 265–274 (2019).
166. Suryawanshi, J. A. S. Phytosome: An emerging trend in herbal drug treatment. *Journal of Medical Genetics and Genomics* **3**, 109–114 (2011).
167. Michael, V. *et al.* Phytosome: A Novel Drug Delivery System for Herbal Medicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* **2**, 224–228 (2010).
168. Hou, Z. *et al.* Phytosomes loaded with mitomycin C-soybean phosphatidylcholine complex developed for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics* **10**, 90–101 (2013).
169. Matias, D. *et al.* Plectranthus madagascariensis phytosomes: formulation optimization. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research* **12**, 223–231 (2015).
170. Catarina Reis & Ana Antunes. Sistemas nanoparticulados aplicados à dermocosmética. (2016).

171. Tripathy, S., Patel, D., ... L. B.-J. of D. D. & 2013, undefined. A review on phytosomes, their characterization, advancement & potential for transdermal application. *jddtonline.info* **2013**, 147–152 (2011).
172. Rogers, L. L. Using sensory techniques for shelf-life assessment. *Sensory Analysis for Food and Beverage Quality Control* 143–155 (2010) doi:10.1533/9781845699512.3.143.
173. Subramaniam, P. & Wareing, P. *The stability and shelf life of food*. (2016).
174. Hosseini, S. F., Ramezanzade, L. & McClements, D. J. Recent advances in nanoencapsulation of hydrophobic marine bioactives: Bioavailability, safety, and sensory attributes of nano-fortified functional foods. *Trends in Food Science & Technology* **109**, 322–339 (2021).
175. Valéria Paula Rodrigues Minim, R. de C. *Análise Sensorial Descritiva*. (2016).
176. Drake, M. A. & Delahunty, C. M. Analytical Methods | Sensory Evaluation. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* 279–283 (2011) doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00030-3.
177. Civille, G. V. & Oftedal, K. N. Sensory evaluation techniques — Make “good for you” taste “good.” *Physiology & Behavior* **107**, 598–605 (2012).
178. Dias, P. G. I., Sajiwani, J. W. A. & Rathnayaka, R. M. U. S. K. Consumer perception and sensory profile of probiotic yogurt with added sugar and reduced milk fat. *Heliyon* **6**, e04328 (2020).
179. Dutcosky, S. D. *Análise sensorial de alimentos*. (Champagnat, 2011).
180. Debnath, D., Nath, B. D., Pervin, R. & Hossain, M. A. Sensory drivers of food behavior. *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health* 131–155 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-816918-6.00006-8.
181. Sarah E. Kemp, T. H. *Sensory Evaluation: A Practical Handbook*. (2009).
182. Bredie, W. L. P. & Møller, P. Overview of sensory perception. *Alcoholic Beverages* 3–23 (2012) doi:10.1533/9780857095176.1.3.
183. Hosseini, H. & Jafari, S. M. Introducing nano/microencapsulated bioactive ingredients for extending the shelf-life of food products. *Advances in Colloid and Interface Science* **282**, 102210 (2020).
184. R. Steele. *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food*. (2004).
185. Kong, F. & Singh, R. P. Chemical Deterioration and Physical Instability of Foods and Beverages. *The Stability and Shelf Life of Food* 43–76 (2016) doi:10.1016/B978-0-08-100435-7.00002-2.
186. Rahman, M. S., Al-Belushi, R. M., Guizani, N., Al-Saidi, G. S. & Soussi, B. Fat oxidation in freeze-dried grouper during storage at different temperatures and moisture contents. *Food Chemistry* **114**, 1257–1264 (2009).
187. Yan, S. *et al.* Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator. *Food Control* **19**, 315–319 (2008).

188. Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M. & Barry-Ryan, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science and Technology* **18**, 373–386 (2007).
189. Taub, I. A. & Singh, R. Paul. Food storage stability. 539 (1998).
190. Mortensen, G., Bertelsen, G., Mortensen, B. K. & Stapelfeldt, H. Light-induced changes in packaged cheeses - A review. *International Dairy Journal* **14**, 85–102 (2004).
191. Refsgaard, H. H. F. *et al.* Light-induced sensory and chemical changes in aquavit. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 425–435 (1995).
192. Protein oxidation and implications for muscle food quality. *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. (John Wiley & Sons, Inc. Publication, 2000).
193. van linden, V., Scheerlinck, N., Desmet, M. & de Baerdemaeker, J. Factors that affect tomato bruise development as a result of mechanical impact. *Postharvest Biology and Technology* **42**, 260–270 (2006).
194. van Zeebroeck, M. *et al.* Impact damage of apples during transport and handling. *Postharvest Biology and Technology* **45**, 157–167 (2007).
195. Fabra, M. J., Talens, P., Moraga, G. & Martínez-Navarrete, N. Sorption isotherm and state diagram of grapefruit as a tool to improve product processing and stability. *Journal of Food Engineering* **93**, 52–58 (2009).
196. Taoukis, P., Labuza, T. & IS Saguy. Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction. *academia.edu* (1997) doi:10.1201/9781420049077.CH9.
197. CHIRIFE, J. & MARÍA DEL BUERA, P. Water Activity, Glass Transition and Microbial Stability in Concentrated/Semimoist Food Systems. *Journal of Food Science* **59**, 921–927 (1994).
198. Rahman, M. S. State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability. *Trends in Food Science and Technology* **17**, 129–141 (2006).
199. Rauh, V. & Xiao, Y. The shelf life of heat-treated dairy products. *International Dairy Journal* **125**, 105235 (2022).
200. Carl A. Batt, P. P. *Encyclopedia of Food Microbiology*. vol. 1 (2014).
201. BELITZ, H. D. ; S. Food Chemistry - Water. in 1–7 (2009).
202. Andrewes, P. Predicting the shelf-life of microbially-stabilised dairy products: What are the roles of stability studies, storage trials, ‘accelerated’ trials, and dairy science? *International Dairy Journal* **125**, 105239 (2022).
203. NEW ZEALAND FOOD SAFETY AUTHORITY. Information Booklet for the Food Industry A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods.
204. Singh, D., Rawat, • M, Semalty, A. & Semalty, M. Chrysophanol-phospholipid complex A drug delivery strategy in herbal novel drug delivery system (HNDDS). doi:10.1007/s10973-012-2448-6.
205. Florindo, C. *et al.* Evaluation of solubility and partition properties of ampicillin-based ionic liquids. *International Journal of Pharmaceutics* **456**, 553–559 (2013).

206. Kumar, S., Baldi, A. & Sharma, D. K. Characterization and In vitro investigation of antiscabietic effect of phytosomes assimilating quercetin and naringenin rich fraction of *Pistacia integerrima* galls extract against *Sarcoptes scabiei*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **67**, 102851 (2022).
207. Cassani, L. *et al.* Thermochemical Characterization of Eight Seaweed Species and Evaluation of Their Potential Use as an Alternative for Biofuel Production and Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, Vol. 23, Page 2355 **23**, 2355 (2022).
208. Nguyen, L. & Hwang, E. S. Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*aronia melanocarpa*) juice. *Preventive Nutrition and Food Science* **21**, 330–337 (2016).
209. Ghorbanzade, T., Mahdi Jafari, S., Akhavan, S. & Hadavi, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. (2016) doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.022.
210. Rabbani, M. *et al.* Phytosomal nanocarriers for encapsulation and delivery of resveratrol-Preparation, characterization, and application in mayonnaise. (2021) doi:10.1016/j.lwt.2021.112093.
211. Saeed, M., Shinawar, •, Ali, W. & Ramzan, S. Physicochemical analysis of mango flavored yogurt supplemented with moringa oleifera leaf powder. *Journal of Food Science and Technology* **58**,.
212. Liu, K. Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. *Algal Research* **40**, 101486 (2019).
213. Soares, C., Tenreiro Machado, J. A., Lopes, A. M., Vieira, E. & Delerue-Matos, C. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of beverages. *Food Chemistry* **302**, 125345 (2020).
214. Noël, L., Carl, M., Vastel, C. & Guérin, T. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium content in milk products by flame atomic absorption spectrometry (FAAS): A joint ISO/IDF collaborative study. *International Dairy Journal* **18**, 899–904 (2008).
215. Regulamento (UE) N. o 1169/2011 do parlamento europeu e do conselho. *Jornal Oficial da União Europeia* (2011).
216. FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497–509 (1957).
217. Ramalhosa, M. J. *et al.* Lipid content of frozen fish: Comparison of different extraction methods and variability during freezing storage. *Food Chemistry* **131**, 328–336 (2012).
218. Masuko, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* **339**, 69–72 (2005).
219. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350–356 (1956).

220. Nielsen, S. S. *Food Science Text Series Food Analysis Laboratory Manual*. (Springer).
221. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88–95 (1961).
222. Song, Q. *et al.* Lipoprotein-Based Nanoparticles Rescue the Memory Loss of Mice with Alzheimer's Disease by Accelerating the Clearance of Amyloid-Beta. **11**, 38 (1190).
223. Karmali, P. P. *et al.* Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **5**, 73–82 (2009).
224. Kumar, S., Baldi, A. & Sharma, D. K. Characterization and In vitro investigation of antiscabietic effect of phytosomes assimilating quercetin and naringenin rich fraction of Pistacia integerrima galls extract against Sarcoptes scabiei. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **67**, 1773–2247 (2022).
225. Telange, D. R., Sohail, N. K., Hemke, A. T., Kharkar, P. S. & Pethe, A. M. Phospholipid complex-loaded self-assembled phytosomal soft nanoparticles: evidence of enhanced solubility, dissolution rate, ex vivo permeability, oral bioavailability, and antioxidant potential of mangiferin. *Drug Delivery and Translational Research* **11**, 1056–1083 (2021).
226. Pathan, R. A. & Bhandari, U. Preparation & characterization of embelin-phospholipid complex as effective drug delivery tool. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **69**, 139–147 (2011).
227. Xu, K. *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activities of luteolin-phospholipid complex. *Molecules* **14**, 3486–3493 (2009).
228. Cassani, L. *et al.* Thermochemical Characterization of Eight Seaweed Species and Evaluation of Their Potential Use as an Alternative for Biofuel Production and Source of Bioactive Compounds. (2022) doi:10.3390/ijms23042355.
229. Telange, D. R., Sohail, N. K., Hemke, A. T., Kharkar, P. S. & Pethe, A. M. Phospholipid complex-loaded self-assembled phytosomal soft nanoparticles: evidence of enhanced solubility, dissolution rate, ex vivo permeability, oral bioavailability, and antioxidant potential of mangiferin. doi:10.1007/s13346-020-00822-4.
230. Ajay Semalty & Yuveraj Singh Tanwar. Phosphatidylcholine complex in improving oral drug delivery of epicatechin: preparation and characterization. 46–55 (2014).
231. Permana, A. D. *et al.* Phytosomal nanocarriers as platforms for improved delivery of natural antioxidant and photoprotective compounds in propolis: An approach for enhanced both dissolution behaviour in biorelevant media and skin retention profiles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **205**, (2020).
232. Singh, D., Rawat, M. S. M., Semalty, A. & Semalty, M. Chrysophanol-phospholipid complex: A drug delivery strategy in herbal novel drug delivery system (HNDDS). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **111**, 2069–2077 (2013).
233. Kumar, S., Baldi, A. & Sharma, D. K. Characterization and In vitro investigation of antiscabietic effect of phytosomes assimilating quercetin and naringenin rich fraction of Pistacia integerrima galls extract against Sarcoptes scabiei. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **67**, 1773–2247 (2022).

234. Winblad, B., Messamore, E., O'Neill, C. & Cowburn, R. Biochemical pathology and treatment strategies in Alzheimer's disease: Emphasis on the cholinergic system. *Acta Neurologica Scandinavica* **88**, 4–6 (1993).
235. Perry, E. K. The cholinergic hypothesis-ten years on. *British Medical Bulletin* **42**, 63–69 (1986).
236. Enz, A., Amstutz, R., Boddeke, H., Gmelin, G. & Malanowski, J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: A novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research* **98**, 431–438 (1993).
237. Grossberg, G. T. Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease:: Getting On and Staying On. *Current Therapeutic Research* **64**, 216–235 (2003).
238. Lane, R. M., Potkin, S. G. & Enz, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. (2005) doi:10.1017/S1461145705005833.
239. Savaghebi, D., Ghaderi-Ghahfarokhi, M. & Barzegar, M. Encapsulation of *Sargassum boveanum* Algae Extract in Nano-liposomes: Application in Functional Mayonnaise Production. *Food and Bioprocess Technology* **14**, 1311–1325 (2021).
240. Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A. & Maherani, B. Nanoliposomes Containing Pistachio Green Hull's Phenolic Compounds as Natural Bio-Preservatives for Mayonnaise. (2018) doi:10.1002/ejlt.201800086.
241. Savaghebi, D., Ghaderi-Ghahfarokhi, M. & Barzegar, M. Encapsulation of *Sargassum boveanum* Algae Extract in Nano-liposomes: Application in Functional Mayonnaise Production. *Food and Bioprocess Technology* **14**, 1311–1325 (2021).
242. Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H. & Neves, A. R. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances* **31**, 764–788 (2013).
243. Patel, P. *et al.* Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. *Journal of Food Science and Technology* **56**, 3721 (2019).
244. Almusallam, I. A. *et al.* Effect of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) spikelets extract on the physicochemical and microbial properties of set-type yogurt during cold storage. *LWT* **148**, 111762 (2021).
245. Robertson, R. C. *et al.* An assessment of the techno-functional and sensory properties of yoghurt fortified with a lipid extract from the microalga *Pavlova lutheri*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **37**, 237–246 (2016).
246. Öztürk, H. İ. *et al.* Fortification of set-type yoghurts with *Elaeagnus angustifolia* L. flours: Effects on physicochemical, textural, and microstructural characteristics. *LWT* **90**, 620–626 (2018).
247. Kwon, H. C., Bae, H., Seo, H. G. & Han, S. G. Short communication: Chia seed extract enhances physicochemical and antioxidant properties of yogurt. *Journal of Dairy Science* **102**, 4870–4876 (2019).

248. Correia, H. *et al.* Seaweeds rehydration and boiling: Impact on iodine, sodium, potassium, selenium, and total arsenic contents and health benefits for consumption. *Food and Chemical Toxicology* **155**, (2021).
249. Lin, M. Y. & Yen, C. L. Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation Product-Scavenging Ability of Yogurt Organisms. *J Dairy Sci* **82**, 1629–1634 (1999).
250. Marín, D., Alemán, A., Montero, P. & Gómez-Guillén, M. C. Encapsulation of food waste compounds in soy phosphatidylcholine liposomes: Effect of freeze-drying, storage stability and functional aptitude. *Journal of Food Engineering* **223**, 132–143 (2018).
251. Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X. & Singh, H. Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International* **42**, 1093–1098 (2009).
252. Estudo do conteúdo mineral de iogurtes naturais e com sabor de frutas, comercializados na cidade de São Paulo, Brasil.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000200015.
253. Pereira, L. Therapeutic and Nutritional Uses of Algae. *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae* (2018) doi:10.1201/9781315152844.
254. Arnold, M., Rajagukguk, Y. V. & Gramza-Michałowska, A. Functional Food for Elderly High in Antioxidant and Chicken Eggshell Calcium to Reduce the Risk of Osteoporosis—A Narrative Review. *Foods 2021, Vol. 10, Page 656* **10**, 656 (2021).
255. Arnold, M., Rajagukguk, Y. V. & Gramza-Michałowska, A. Functional Food for Elderly High in Antioxidant and Chicken Eggshell Calcium to Reduce the Risk of Osteoporosis—A Narrative Review. *Foods 2021, Vol. 10, Page 656* **10**, 656 (2021).
256. Rao, L. G., Kang, N. N. & Rao, A. v. Lycopene and Other Antioxidants in the Prevention and Treatment of Osteoporosis in Postmenopausal Women. *Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* 247–258 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-405933-7.00024-X.
257. Decreto-Lei 54/2010. <https://dre.tretas.org/dre/275090/decreto-lei-54-2010-de-28-de-maio>.
258. Gupta, S. & Abu-Ghannam, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **12**, 600–609 (2011).
259. Whelton, P. K. Sodium, Potassium, Blood Pressure, and Cardiovascular Disease in Humans. *Current Hypertension Reports 2014 16:8* **16**, 1–8 (2014).
260. Whelton, P. K. Sodium, Potassium, Blood Pressure, and Cardiovascular Disease in Humans. *Current Hypertension Reports 2014 16:8* **16**, 1–8 (2014).
261. Yang, Q. *et al.* Sodium and Potassium Intake and Mortality Among US Adults: Prospective Data From the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of Internal Medicine* **171**, 1183–1191 (2011).
262. O’Sullivan, A. M. *et al.* Seaweed extracts as potential functional ingredients in yogurt. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **37**, 293–299 (2016).

Bibliografia

Anexos

A - Determinação da Solubilidade Octanol-Água e Coeficiente de partição

A.1 - Curva de calibração para determinação da Solubilidade em Água

No decorrer desta determinação foi necessário preparar soluções da fração F4 de concentrações entre 0,01 e 0,2 mg/mL.

As diluições foram preparadas a partir da solução mãe de 1mg/mL, usando como solvente água ultrapura em balões volumétricos.

Tabela A. 1 - Valores da concentração em mg/mL e das absorvâncias medidas a λ 280 nm das soluções padrão de Extrato/H₂O

Concentração (mg/mL)	Absorvância (n=3)			Absorvância (média)	Desvio Padrão
0,200	0,589	0,616	0,597	0,601	0,011
0,100	0,366	0,367	0,380	0,371	0,006
0,0500	0,218	0,217	0,232	0,222	0,007
0,0200	0,148	0,150	0,148	0,149	0,001
0,0100	0,108	0,124	0,120	0,117	0,007

Figura A. 1 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de Extrato/H₂O, com H₂O ultrapura

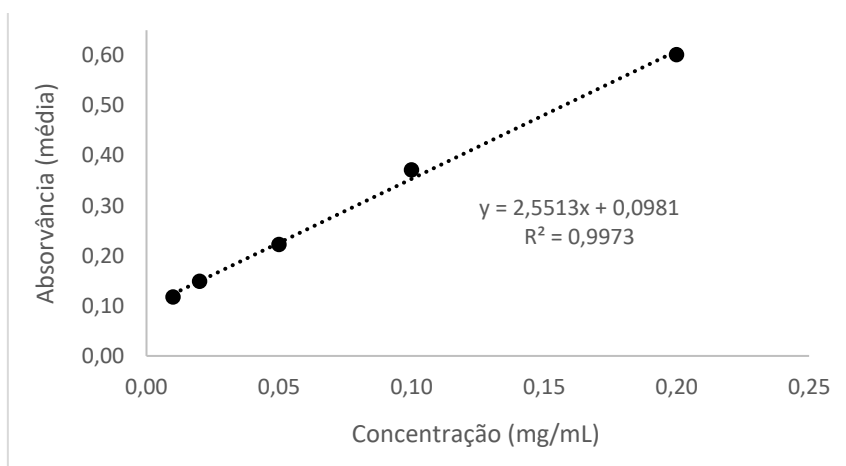


Tabela A. 2 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/mL)	0,014
LOQ (mg/mL)	0,047

$$LOD = 3 \times \left(\frac{SD}{m} \right)$$

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{SD}{m}\right)$$

Tabela A. 3 - Registo dos valores obtidos das absorvâncias para as amostras Extrato/H₂O e Fitossoma/H₂O, respetivas concentrações com e sem fator de diluição (n=3)

1:5 (n=3)				Concentração Extrato/H ₂ O (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Extrato/H ₂ O (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,425	0,384	0,412	0,407	1,136	10	11,365
1:10 (n=3)				Concentração (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,261	0,274	0,266	0,267	0,779	20	15,586

1:5 (n=3)				Concentração Fitossoma/H ₂ O (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Fitossoma/H ₂ O (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,305	0,276	0,281	0,287	0,831	10	8,312
1:10 (n=3)				Concentração (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Fitossoma/H ₂ O (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,231	0,201	0,206	0,213	0,641	20	12,814

Concentração corrigida (mg/mL)		
Amostra	Média	Desvio Padrão
Extrato/H ₂ O	13,5	2,1
Fitossoma/H ₂ O	10,6	2,3

A.2 – Curva de calibração para determinação da Solubilidade em n-Octanol

No decorrer desta determinação foi necessário preparar de soluções da fração F4 com concentrações entre 0,01 e 0,5 mg/mL.

As diluições foram preparadas a partir da solução mãe de 1mg/mL, usando como solvente n-Octanol em balões volumétricos.

Tabela A. 4 - Valores da concentração em mg/mL e das absorvâncias medidas a λ 280 nm das soluções padrão de Extrato/n-Octanol

Concentração (mg/mL)	Absorvância (n=3)			Absorvância (média)	Desvio Padrão
0,5	0,674	0,643	0,604	0,640	0,029
0,2	0,285	0,312	0,263	0,286	0,020
0,1	0,189	0,147	0,175	0,170	0,017
0,05	0,066	0,088	0,061	0,0710	0,012
0,01	0,012	0,009	0,016	0,0120	0,003

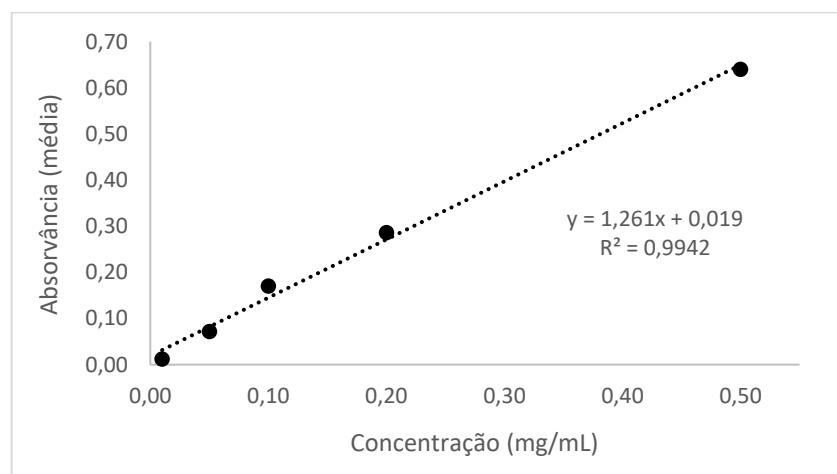


Figura A. 2 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de Extrato/n-Octanol

Tabela A. 5 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/mL)	0,0520
LOQ (mg/mL)	0,174

Tabela A. 6 - Registo dos valores obtidos das absorvâncias para as amostras Extrato/n-Octanol e Fitossoma/n-Octanol, respetivas concentrações com e sem fator de diluição (n=3)

1:5 (n=3)				Concentração Extrato/n-Octanol (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Extrato/n-Octanol (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,355	0,357	0,362	0,358	0,0641	10	0,641
1:10 (n=3)				Concentração Extrato/n-Octanol (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Extrato/n-Octanol (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,167	0,164	0,150	0,160	0,039	20	0,784

1:5 (n=3)				Concentração Fitossoma/n-Octanol (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Fitossoma/n-Octanol (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,292	0,304	0,245	0,280	0,372	10	3,721
1:10 (n=3)				Concentração Fitossoma/n-Octanol (mg/mL)	Fator de Diluição	Concentração corrigida Fitossoma/n-Octanol (mg/mL)
A1	A2	A3	Média			
0,163	0,163	0,146	0,157	0,217	20	4,340

Concentração corrigida (mg/mL)		
Amostra	Média	Desvio Padrão
Extrato/n-Octanol	0,712	0,071
Fitossoma/n-Octanol	4,03	0,303

B - Determinação do Teor de Minerais

B.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de Magnésio (Mg), Cálcio (Ca), Potássio (K) e Sódio (Na)

No decorrer desta determinação foram efetuadas leituras de soluções padrão de Mg, Ca, K e Na (Fig. B.1, B.2, B.3 e B.4)

As diluições foram preparadas a partir das amostras finais da análise do teor de cinzas, às quais foi adicionado 1 mL de ácido nítrico (HNO₃) em balão volumétrico de 100 mL, e o restante volume perfeito com água ultrapura. Esta solução foi diluída com a solução de 1% HNO₃ sempre que necessário

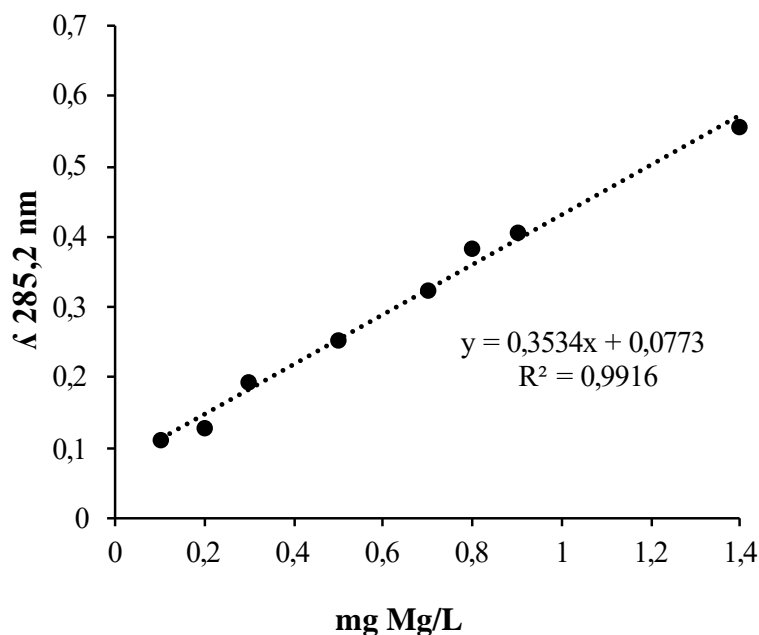


Figura B 1 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão Mg

Tabela B 1 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/L)	0,230
LOQ (mg/L)	0,766

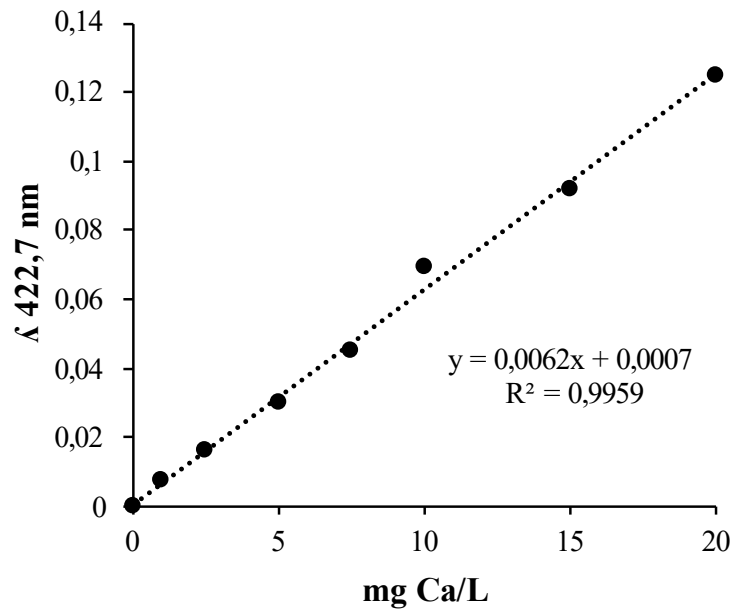


Figura B 2 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão Ca

Tabela B 2 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/L)	1,468
LOQ (mg/L)	4,894

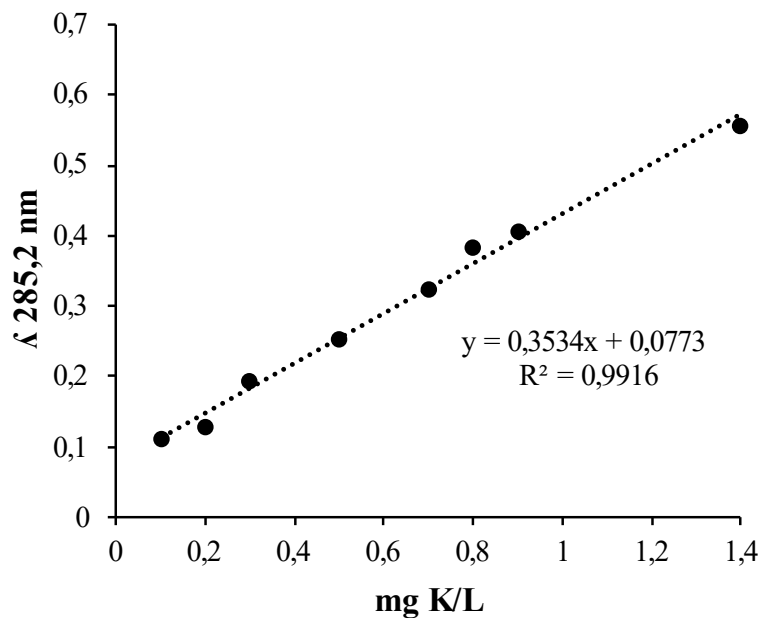


Figura B 3 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão K

Tabela B 3 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/L)	1,468
LOQ (mg/L)	4,894

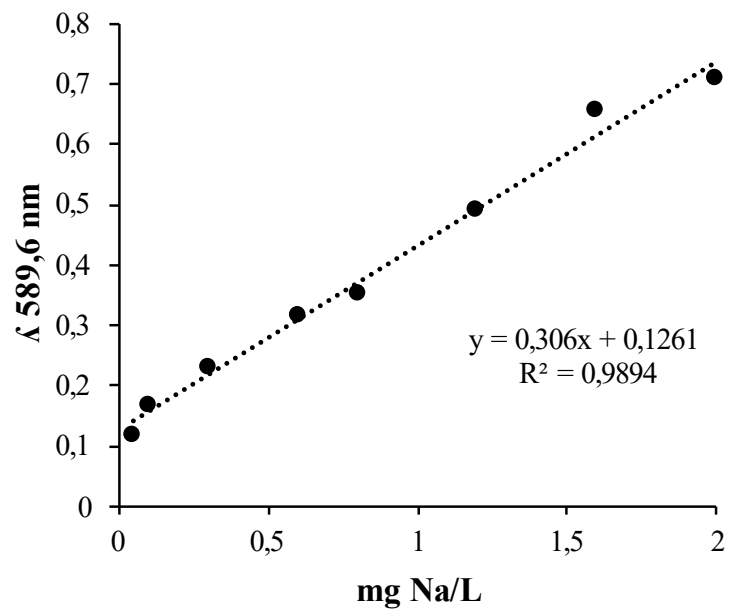


Figura B 4 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão Na

Tabela B 4 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/L)	0,240
LOQ (mg/L)	0,799

C - Determinação do Teor de Açúcares Totais

C.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de Pentoses

No decorrer desta determinação foi necessário preparar soluções de glucose de concentrações entre 0,05 e 1 mg/mL.

As diluições foram preparadas a partir da solução mãe de 1mg/mL, usando como solvente água ultrapura em balões volumétricos.

Tabela C. 7 - Valores da concentração em mg/mL e das absorvâncias medidas a λ 480 nm das soluções padrão de Glucose

mg Glucose/mL	λ 480 Corrigida	Média (n =2)	Desvio padrão
0,05	0,1815	0,177	0,005
	0,1715		
0,10	0,2585	0,261	0,002
	0,2625		
0,15	0,3475	0,353	0,006
	0,3585		
0,20	0,4745	0,493	0,019
	0,5115		
1,00	1,4585	1,48	0,03
	1,5105		

Figura C. 3 - Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de Glucose

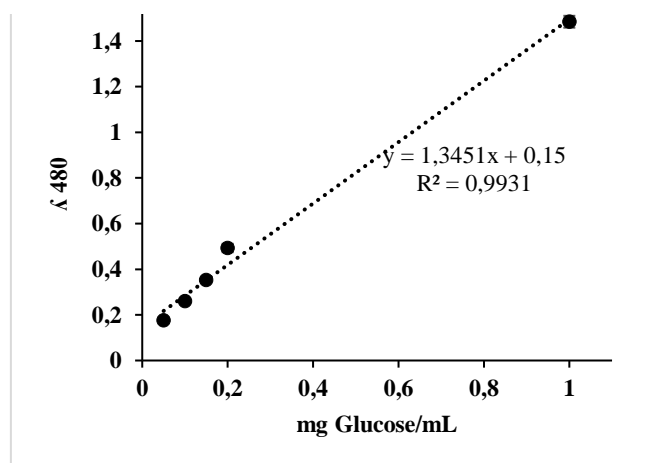


Tabela C. 8 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/mL)	0,114
LOQ (mg/mL)	0,380

C.2 - Curva de calibração para determinação da concentração de Hexoses

No decorrer desta determinação foi necessário preparar soluções de glucose de concentrações entre 0,05 e 1 mg/mL.

As diluições foram preparadas a partir da solução mãe de 1mg/mL, usando como solvente água ultrapura em balões volumétricos.

Tabela C. 3 - Valores da concentração em mg/mL e das absorvâncias medidas a λ 490 nm das soluções padrão de Glucose

mg Glucose/mL	λ 490 Corrigida	Média	Desvio padrão
0,05	0,2355	0,238	0,002
0,05	0,2395		
0,1	0,3205	0,323	0,0025
0,1	0,3255		
0,15	0,4195	0,4065	0,013
0,15	0,3935		
0,2	0,5015	0,521	0,019
0,2	0,5395		
1	1,5785	1,60	0,02
1	1,6255		

Figura C. 2- Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de Glucose

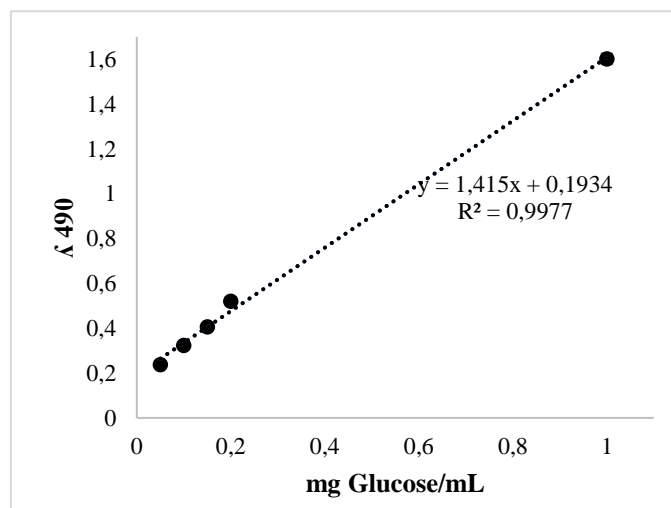


Tabela C. 4 - Valores referentes aos limites de detecção e quantificação

LOD (mg/mL)	0,069
LOQ (mg/mL)	0,229