



Daniela Cristina Gonçalves Costa

Desenvolvimento de novos alimentos com propriedades antioxidantes à base de tomate e soro de leite

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e pelo Professor Doutor Carlos Dias Pereira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Cristina Gonçalves Costa

Desenvolvimento de novos alimentos com propriedades antioxidantes à base de tomate e soro de leite

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e pelo Professor Doutor Carlos Dias Pereira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Que o seu remédio seja o seu alimento, e que o seu alimento seja seu remédio”

Hipócrates, século V a

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Ramos, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser o maior incentivador para a realização deste projeto, permitindo que ele fosse concretizável. Também por todo o apoio despendido em garantir parcerias empresariais fulcrais para este trabalho. Agradeço também o acompanhamento e orientação que prestou, para além de contribuir com o seu conhecimento, sempre que necessário, permitindo o sucesso desta dissertação.

Ao Professor Doutor Carlos Dias Pereira, coorientador deste trabalho por ter contribuído para a execução do meu trabalho prático, estando sempre disponível para responder às minhas questões acerca das mais diversas técnicas laboratoriais empregadas nesta investigação. Agradeço também a pronta disponibilidade e ajuda de todos aqueles que trabalham na Oficina Tecnológica de Laticínios da Escola Superior Agrária de Coimbra¹ e pela oportunidade da realização deste projeto e pelo apoio que me manifestaram através da utilização de equipamento fulcral para o arranque deste trabalho.

À professora Doutora Maria Conceição Castilho, por toda ajuda, pela pronta disponibilidade e pela sua carismática simpatia.

Um grande obrigado à Dona Anabela do laboratório de bromatologia, pela sua alegria contagiante no seu trabalho e pela pronta ajuda que manifestou ao longo da realização deste projeto.

Ao João Rosa, quero agradecer pela disponibilidade e pronta ajuda a nível laboratorial que foi sem dúvida imprescindível para o término da vertente laboratorial deste projeto.

Um especial agradecimento à instituição que me acolheu há cinco anos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e a todos aqueles que de alguma maneira a representam e que permitiram que a minha formação não fosse meramente a realização de unidades curriculares, mas tudo aquilo que é permitido no ensino superior. Obrigado por terem contribuído com os mais diversos mecanismos e ferramentas para que a minha formação se

¹ Os trabalhos realizados na Oficina Tecnológica de laticínios da Escola Superior Agrária de Coimbra tiveram o suporte financeiro do ministério da agricultura e do desenvolvimento rural, cofinanciado pelo fundo europeu de desenvolvimento rural (FEADR) através do programa PDR2020, no âmbito do projeto LACTIES-Inovação, Ecoeficiência e Segurança em PME's do setor dos laticínios (PDR2020-101030768).

tornasse diferenciada. Obrigada por me ter disponibilizado todos os equipamentos e infraestruturas para poder realizar o meu projeto.

Ao senhor José Veríssimo, que prontamente forneceu 10Kg de tomate para os mais diversos trabalhos experimentais.

À Rita Santos por todo apoio e carinho, amizade e paciência diária que me manifestou. Agradeço, de forma muito especial, a partilha de muitos bons momentos e a preocupação durante momentos de maior aflição. O seu apoio foi muito importante para no desenvolvimento deste projeto, colaborando com trocas de opinião e de conhecimentos laboratoriais.

Ao meu namorado, Pedro Silva, pelas diretrizes para a realização de uma dissertação com o maior sucesso e pelo tempo despendido para me ouvir. Para além da sua revisão ímpar e crítica.

Aos meus familiares mais próximos que contribuíram de alguma forma para que tudo isto foi exequível e por todo o apoio emocional dispensado nos obstáculos que se foram cruzando com o meu caminho. Não deixando de lado aqueles que também fazem parte da minha família, aos meus amigos e a todo o 3º piso da residência António José de Almeida.

A todos, não deixando de lado aqueles que não foram mencionados, mas que não estão esquecidos, estou grata por permitirem mais um fecho de um ciclo tão importante na minha vida.

Muito obrigada!

Resumo

O fenômeno da globalização, a aceleração do ritmo de vida e crescente preocupação com o bem-estar físico e com a saúde tem vindo a refletir-se em alterações profundas na escolha dos alimentos introduzidos no nosso quotidiano. Além disso, cada vez mais, os consumidores procuram estar informados e interpretam cuidadosamente a rotulagem. Este paradigma cultivou-se através da percepção que uma alimentação equilibrada e rica em alguns compostos bioativos ou funcionais, possa ter na diminuição do risco de desenvolver determinadas patologias.

Por outro lado, o consumidor interessa-se cada vez mais por produtos que tenham missões, como a sustentabilidade alimentar e ambiental, tornando-se pontos de atração para a compra daqueles produtos.

A presente dissertação de mestrado incidiu na utilização de dois subprodutos alimentares, o soro de leite e o tomate rejeitado para venda direta. Um dos objetivos desta investigação foi desenvolver dois produtos alimentares (produto proteico e produto energético), tendo por base estes subprodutos, que apresentassem no final características benéficas para saúde e paralelamente contribuíssem para a minimização de subprodutos alimentares, bem como os problemas ético económicos a estes associados. Posteriormente, após chegar a uma formulação final dos produtos, estudaram-se os produtos desenvolvidos quanto à sua composição centesimal, capacidade antioxidante e presença de licopeno. A capacidade antioxidante foi determinada através de dois ensaios, sistema de inibição do radical livre DPPH e teste do branqueamento do β -caroteno. Foi também determinado o conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides. Por fim, determinou-se a concentração de licopeno por HPLC, dado ao interesse e relevância, inato às suas propriedades, entre as quais, a prevenção de doenças cardiovasculares (DCV) e do cancro, sobretudo o da próstata.

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos, no que diz respeito aos três extratos (fruta, produto proteico e produto energético) utilizados, concluiu-se a presença de atividade antioxidante. O extrato de fruta (tomate e cenoura) foi o que apresentou uma maior capacidade antioxidante em ambos os métodos, com maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides. Quanto aos extratos dos dois produtos desenvolvidos, os melhores resultados, tanto a nível da capacidade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides, foram obtidos no extrato do produto proteico.

O teor em licopeno também foi estudado para os três extratos, anteriormente, referidos. Observou-se que o produto proteico possui um teor em licopeno superior aos outros dois extratos. Quando comparados os outros extratos (fruta e produto energético), o produto energético apresentou teor em licopeno superior. Estes resultados, podem estar, relacionados com a possível formação de complexos entre este composto antioxidante e as proteínas presentes nos produtos.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que os produtos desenvolvidos são duas fontes ricas em compostos bioativos, sendo que os dois subprodutos contribuem de maneira distinta nos produtos. O soro de leite apresenta pequenos péptidos cruciais na tensão arterial e proteínas de maior absorção quando comparadas com as do leite. Enquanto que o tomate incrementa nos produtos, os seus compostos antioxidantes, entre os quais o licopeno, que é classificado como um dos melhores supressores de radicais livres. Tudo isto numa solução viável para a indústria alimentar, demonstrando a possibilidade de criar produtos, como estes, que satisfaçam o consumidor.

Palavras-chave: Dieta mediterrânica, tomate, licopeno, soro de leite, proteína, sustentabilidade, bebidas.

Abstract

Globalization, hectic life style and general awareness regarding health and well-being are three phenomenon's that have had a profound impact in alimentary choices over the recent years. Has a result, consumers are introducing new food products in their diets and have developed an interest in careful interpretation of food labels. This change in paradigm was cultivated through the perception that a balanced diet rich in some bioactive or functional compounds, may contribute to reducing the risk of developing certain pathologies.

In addition, consumers are increasingly interested in products that are more than their basic nutritional value. Features like food and environmental sustainability, becoming points of interest when deciding which products to buy.

The present master's dissertation focused on the use of two food byproducts, whey and tomato not proper for direct commerce. One of the objectives of this research was to develop two food products (protein product and energy product), based on these byproducts. These should have the following characteristics: be beneficial to health and also contribute to the reduction of food byproducts as well as ethical economic problems to these associates. Subsequently, after reaching a final formulation, the products developed were evaluated for their centesimal composition, antioxidant capacity and presence of lycopene. The antioxidant capacity was determined through two assays, DPPH free radical inhibition system and β -carotene bleaching test. In addition, the content of phenolic compounds and flavonoids was also determined. Finally, the concentration of lycopene was determined by HPLC, given the interest and relevance, innate to its properties, among which, the prevention of CVD and cancer, particularly prostate tumours.

The results obtained for the phenolic compounds, with respect to the three extracts (fruit, protein product and energy product) used, were concluded the presence of antioxidant activity. The fruit extract (tomato and carrot) presented the highest antioxidant capacity in both methods, with higher contents of phenolic compounds and flavonoids. As for the extracts of the two products developed, the best results, both in antioxidant capacity, phenolic compounds and flavonoids, were obtained in the extract of the protein product extract.

The lycopene content was also studied for the three extracts previously mentioned. It has been observed that the protein product has a lycopene content higher than the other two extracts. When comparing the other extracts (fruit and energy product), the energy product

had higher lycopene content. These results may be related to the possible formation of complexes between this antioxidant compound and the proteins present in the products.

In conclusion, the results indicate that the products developed are two sources rich in bioactive compounds, and the two by-products contribute in a distinct way in the final products. Whey contains small crucial peptides with effects on blood pressure reduction and higher absorption proteins when compared to milk. In addition, tomatoes increase the antioxidant compound present in the products, among them lycopene, which is classified as one of the best suppressors of free radicals. All this in a viable solution for the food industry, demonstrating the possibility of creating products, such as this, that satisfy the customer.

Keywords: Mediterranean diet, tomato, lycopene, milk serum (whey), protein, sustainability, drinks.

Índice

| | |
|--|-------------|
| Resumo | v |
| Abstract | vii |
| Lista de Abreviaturas | x |
| Índice de Figuras | xii |
| Índice de Tabelas | xiii |
| Capítulo I- Introdução | 1 |
| 1.1 Novas tendências de consumo de alimentos | 3 |
| 1.2 Dieta mediterrânea | 6 |
| 1.3 Tomate | 7 |
| 1.3.1 Origem e importância econômica | 7 |
| 1.3.2 Composição nutricional..... | 10 |
| 1.4 Capacidade Antioxidante | 12 |
| 1.5 Carotenoides | 15 |
| 1.5.1 Características físico-químicas e sua distribuição na Natureza | 15 |
| 1.5.2 Funções Biológicas no Ser Humano..... | 16 |
| 1.6 Licopeno | 16 |
| 1.6.1 Biodisponibilidade | 17 |
| 1.6.2 Evidências na saúde humana..... | 18 |
| 1.7 Soro de leite | 20 |
| 1.7.1 Subproduto como fonte de compostos bioativos..... | 22 |
| 1.8 Desperdício da indústria alimentar vs ambiente | 25 |
| Capítulo II- Objetivos | 31 |
| Capítulo III- Materiais e Métodos | 34 |
| 3.1 Preparação das amostras de tomate | 35 |
| 3.2 Preparação das amostras de soro de leite | 35 |
| 3.3 Preparação das amostras para o produto final | 37 |
| 3.4 Formulações testadas | 38 |
| 3.5 Métodos de determinação da composição dos produtos finais | 38 |
| 3.5.1 pH..... | 38 |
| 3.5.2 Humidade relativa e sólidos totais..... | 39 |
| 3.5.3 Cinzas | 39 |
| 3.5.4 Proteínas | 39 |
| 3.5.5 Gordura | 40 |
| 3.5.6 Fibra..... | 41 |
| 3.5.7 Cloretos solúveis em água | 41 |
| 3.5.8 Fósforo | 42 |
| 3.5.9 Hidratos de carbono | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 Determinação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante dos extratos das amostras | 43 |
| 3.6.1. Preparação e extração das amostras..... | 43 |
| 3.6.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo sistema de inibição do radical livre DPPH . | 44 |
| 3.6.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo teste do Branqueamento do β -Caroteno .. | 46 |
| 3.6.4 Determinação dos compostos fenólicos totais..... | 47 |
| 3.6.5 Determinação dos compostos flavonoides..... | 49 |
| 3.6.6 Determinação do teor em licopeno | 50 |
| Capítulo IV- Resultados e Discussão | 52 |
| 4.1 Determinação da composição centesimal dos produtos finais | 53 |
| 4.2 Sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do β-Caroteno | 58 |
| 4.3 Determinação do conteúdo em compostos fenólicos e em flavonoides | 60 |
| 4.4 Determinação do teor em licopeno..... | 63 |
| Capítulo V- Conclusão..... | 66 |
| Capítulo VI- Referências Bibliográficas..... | 69 |
| Anexos | 87 |

Lista de Abreviaturas

De seguida, apresenta-se uma listagem das abreviaturas utilizadas neste trabalho, organizadas por ordem alfabética.

| | |
|--------|---|
| AAT | Atividade antioxidante |
| ABT | Ácido 2,2 - azino - bis(3-etilbenzoti-azolin) - 6-sulfônico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AR | Assembleia da República |
| AVC | Acidente Vascular Cerebral |
| CE | Comissão Europeia |
| CCDR | Comissões de Coordenação e Desenvolvimento Regional |
| CLPS | Concentrado líquido de proteína do soro |
| DCV | Doenças Cardiovasculares |
| DGS | Direção-Geral de Saúde |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo |
| ECE | Equivalentes de epicatequina, do inglês, <i>Epicatechin Equivalents</i> |
| EFSA | Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês, <i>European Food Safety Authority</i> |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAO | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FRAP | Poder antioxidante de redução do ferro, do inglês, <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico, do inglês, <i>Gallic Acid Equivalents</i> |
| GEEs | Gases de efeito de estufa |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidade, do inglês, <i>High Density Lipoprotein</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IAN-AF | Inquérito Alimentar Nacional e Atividade Física. |
| INE | Instituto Nacional de Estatística |
| LDL | Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês, <i>Low Density Lipoprotein</i> |
| Min | Minutos |
| OI | Osmose inversa |
| OMS | Organização mundial de saúde |
| ORAC | Capacidade de absorção de radicais livres de oxigénio, do inglês, <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> |
| PE | Parlamento Europeu |

| | |
|--------|--|
| PMA | Programa Mundial de Alimentos das Nações Unidas |
| PUF | Permeado da ultrafiltração |
| PUFC | Permeado da ultrafiltração concentrado |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio, do inglês, <i>Reactive oxygen species</i> |
| UE | União Europeia |
| UF | Ultrafiltração |
| UNESCO | Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, do inglês, <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i> . |
| VIH | Vírus da imunodeficiência humana |

Índice de Figuras

| | |
|--|---|
| Figura nº1- Tendências de consumo de frutas e legumes por habitante, 1970 a 2000 (OMS, 2002) | 8 |
|--|---|

| | |
|--|----|
| Figura nº2 - Tipos de tomate mais consumidos em Portugal | 9 |
| Figura nº3- Estrutura química dos flavonoides (Silva <i>et al.</i> , 2015) | 14 |
| Figura nº4- Dados da recolha de leite de vaca e do efetivo leiteiro na EU em 2015 (INE,2016) | 21 |
| Figura nº5- Esquema do processo de ultrafiltração do soro de leite (Zuñira <i>et al.</i> , 2004) | 22 |
| Figura nº6- Desperdício total estimado de alimentos na EU em 2010, Kg/habitante (Royte,2014) | 26 |
| Figura nº7- Perdas alimentares em cada fase da cadeia dos hortícolas (Baptista <i>et al.</i> , 2012) | 27 |
| Figura nº8- Esquema da técnica de osmose inversa | 36 |
| Figura nº9- Fluxograma do processo de produção de concentrados líquidos de proteínas de soro (CLPS) e permeados de ultrafiltração concentrado por osmose inversa (PUFC) | 37 |
| Figura nº10- Preparação das soluções com diferentes quantidades de trolox para a construção da curva de padrão | 46 |
| Figura nº11- Emulsão | 47 |
| Figura nº12- Determinação do conteúdo em compostos fenólicos da nossa amostra. A) Amostra com o reagente <i>Folin- Ciocalteu</i> . B) Amostra após 2 horas no escuro com formação de uma coloração mais intensa, característica da presença de compostos fenólicos..... | 48 |
| Figura nº13- Determinação do conteúdo em flavonoides totais. A) Preparação das soluções da amostra para análise. B) Amostras no final do ensaio..... | 50 |
| Figura nº14- Cromatogramas resultantes da análise do licopeno na fruta (A), produto proteico (B) e produto energético (C). | 65 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|---|
| Tabela nº1- Cultura tomate em Portugal (INE, 2015)..... | 9 |
|---|---|

| | |
|---|----|
| Tabela nº2- Valores para macronutrientes e energia do tomate por 100g de parte comestível (adaptado de Almeida, 2006) | 10 |
| Tabela nº3- Valores para vitaminas do tomate por 100g de parte comestível (adaptado de Almeida, 2006) | 10 |
| Tabela nº4- Valores para minerais do tomate por 100g de parte comestível (adaptado de Almeida, 2006) | 11 |
| Tabela nº5- Condições de armazenamento recomendadas para os diferentes estados de maturação do tomate (adaptado de Almeida, 2006) | 11 |
| Tabela nº6- Composição característica (mg/100 g de tomate) (adaptado de Martí <i>et al.</i> , 2016)..... | 14 |
| Tabela nº7- Concentração dos diversos Carotenoides no tomate e nos seus derivados, mg/100g (Perveen, <i>et al.</i> 2015) | 17 |
| Tabela nº8- Composição dos diferentes tipos de soro de leite (Slavov, 2017) | 20 |
| Tabela nº9- Características das proteínas no soro de leite (adaptado de Azevedo, 2015).... | 23 |
| Tabela nº10- Valores da produção de leite e derivados, 1986 a 2015 (INE, 2016..... | 29 |
| Tabela nº11- Formulação final de ambos os produtos desenvolvidos | 38 |
| Tabela nº12- Composição das amostras | 44 |
| Tabela nº13- Caracterização físico-química do produto proteico e do produto energético | 54 |
| Tabela nº14- Teste de inibição do radical DPPH com resultados expressos em mg equivalentes de Trolox por g de extrato (mg ET/g extrato) e % de inibição. Teste do branqueamento do β -caroteno com resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC). Todos os resultados apresentam média \pm DP, n=3..... | 59 |
| Tabela nº 15- Conteúdo em compostos fenólicos com resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato) e conteúdo em flavonoides expresso em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato). Os resultados correspondem a média \pm DP, n=3..... | 61 |

Capítulo I- Introdução

A alimentação é um direito humano, uma necessidade primária e, simultaneamente, uma atividade cultural. O ato de comer não trata apenas da ingestão de elementos nutritivos, fundamentais para o organismo, é também uma fonte de prazer e assenta no fator social, promovendo a convivência entre seres humanos (Pereira, 2013). A alimentação detém um papel preponderante na saúde. Para além da influência que exerce sobre as capacidades cognitivas, estudos epidemiológicos afirmam que a alimentação tem também uma ação sobre o estado de espírito (Costa, 2009). Deste modo, “a alimentação consiste em obter do ambiente, uma diversidade de produtos, naturais ou transformados, é assim, um processo de seleção de alimentos, fruto das preferências, das disponibilidades e da aprendizagem de cada indivíduo...” (Viveiros, 2012).

Alguns incidentes no setor alimentar contribuíram para mudanças nos consumidores. Face a esta realidade, o consumidor tem vindo a demonstrar uma maior preocupação e interesse por práticas como a produção e o consumo sustentável, refletindo-se na escolha dos alimentos com menor impacto ambiental. Isto é, no processo de decisão, a responsabilidade social (bem-estar animal e ambiente) intervém como um critério de escolha ao lado de outros como as características sensoriais, nutricionais, preço e facilidade no consumo (Moura, 2011).

Visando a satisfação das preocupações dos consumidores com os problemas de saúde e ambientais, a investigação alimentar tem recaído sobre a inovação e desenvolvimento de produtos alimentares focando-se no aproveitamento de subprodutos da indústria alimentar. Produtos esses, que apresentam a mesma qualidade e segurança para os consumidores, quando comparados com produtos já comercializados.

Na bibliografia já publicada, constatou-se a utilização das proteínas do soro desidratadas para comercialização, além da incorporação do CLPS do soro de leite em produtos lácteos (Pereira *et al.*, 2014). Também a sobreprodução do tomate tem mostrado algumas soluções, entre elas, a extração de licopeno, tanto do tomate em si, como da polpa, da pele e das sementes (Viuda-Martos *et al.*, 2014).

A incorporação de subprodutos alimentares de qualidade e seguros em novos produtos é considerada uma alternativa de sustentabilidade alimentar e ambiental, pois reduz o elevado desperdício resultante da produção e diminui a poluição.

Neste contexto, surgiu o presente estudo, tendo como finalidade desenvolver produtos alimentares sustentáveis com características benéficas para a saúde humana, como por exemplo, os antioxidantes. Tendo em conta que o licopeno é um antioxidante, cada vez mais reconhecido, optou-se pela escolha do tomate na incorporação da base láctea dada a

elevada percentagem de licopeno que compõem este fruto, para além do elevado desperdício que se verifica na produção do tomate, tanto a nível nacional, como mundial. Os produtos serão avaliados nutricionalmente além da sua aceitação junto de voluntários após provas sensoriais.

1.1 Novas tendências de consumo de alimentos

Desde os primórdios da espécie humana, a busca de alimentos para a sobrevivência era essencial. Este paradigma deixou de ter interesse *per se*, todavia, adquire uma nova, embora diferente, relevância com o desenvolvimento da arte de comer e beber, que se torna um prazer pelas diversas características organoléticas que os alimentos apresentam. Conforme demonstram os estudos, há uma relação direta e benéfica entre as dietas ricas em vegetais e fruta e o menor risco de desenvolvimentos de doenças degenerativas (Ames *et al.*, 1993). Este potencial é atribuído, essencialmente, à presença de vitaminas, minerais e compostos fitoquímicos, como os carotenoides, antocianinas, catequinas, entre outros.

A constante preocupação com a alimentação já advém de tempos remotos da civilização. Hipócrates, no século V a.c., descreveu que uma alimentação ideal deve ser particularizada, tendo em conta a idade, atividade física, etc. Na antiguidade clássica, diversos autores manifestaram a relação causa-efeito da alimentação com um estado individual de saúde, prosseguindo-se esse pensamento na idade média (Pereira, 2013).

Ao longo da história, o poder económico e o monopólio do comércio sofreram diversas alterações, promovendo o intercâmbio cultural e gastronómico. Estas mudanças conduziram a alterações marcantes. A agricultura, apresenta, porventura, o melhor destas alterações. Inicialmente, baseada numa economia de subsistência passa para uma cultura intensiva, promovendo a depleção dos solos, originando um desequilíbrio em nutrientes nos alimentos. Além disso, assistiu-se a uma utilização excessiva de fertilizantes, pesticidas e herbicidas que contribuíram para o aumento da poluição ambiental (solos, água e ar). As formas de colher e de armazenar os alimentos também se alteraram. Passou-se de uma colheita para consumo imediato, para uma safra em estado imaturo, conjuntura que pode, ou não, influenciar o conteúdo nutricional dos alimentos. Esta situação explica-se pelo facto de o amadurecimento dos alimentos só ocorrer após a colheita, sendo ainda sujeitos a processos físicos e químicos durante o armazenamento que induzem alterações nos produtos, antes de conquistarem as prateleiras do mercado (Caris-Veyrat *et al.*, 2004; Prego *et al.*, 2002).

Na década de 50, o ritmo da vida quotidiana começou a ficar mais acelerado e *stressante*, tanto a nível profissional, como pessoal, fenómeno que veio promover a procura de soluções rápidas e práticas para as refeições. Deste modo, os estilos alimentares adotados recaem em alimentos refinados, processados, sujeitos a adição de edulcorantes e conservantes, ao que se conjugam as elevadas quantidades de gorduras. Além dos excessos sobre uma alimentação nutricionalmente desequilibrada, característica da *fast-food*, existe uma panóplia de refrigerantes que são ingeridos em excesso. Este paradigma proporciona o aumento da obesidade e, naturalmente, o incremento de doenças cardiovasculares. Encontramos ainda, fruto destas rotinas, doenças oncológicas e degenerativas (Baker e Wellman, 2005). Com estas dúvidas surgiram cada vez mais estudos com o objetivo de avaliar a relação entre a alimentação e saúde.

Consequentemente, os anos 80 foram marcantes na comunidade científica, muito por causa dos estudos mais discriminados da interação alimentação e saúde. Já no século XXI, a geração *Millennials* ganha força e influência no mercado alimentar, contrariando o que até aí era considerado prazer na alimentação. A preocupação desta geração passou a recair sobre os benefícios dos alimentos que potenciavam a saúde, em paralelo com o aumento do interesse pelo culto do corpo, da beleza e da aparência jovem. Erguem-se, assim, inúmeras campanhas de sensibilização para a adoção de opções nutricionais mais vantajosas, observando-se que estas escolhas tinham uma relação estreita com a cultura, política, gastronomia, ciência e sustentabilidade alimentar (Schubert e Schneider, 2016). A construção desta imagem de beleza e de saúde, visa também corresponder a uma situação sociocultural que foi cultivada, sendo a aparência algo cada vez mais valorizada, não só a nível profissional, como social (Borrvalho, 2015).

Acrescenta-se, ainda, o nível de *stress* e o número de horas de trabalho que são obstáculos ao cumprimento de um regime alimentar tradicional de refeições com horário predefinido. Face a este panorama, o mundo encontra-se com tantas pessoas subnutridas como sobre-nutridas. De acordo com os últimos dados, a população mundial tem cerca de 7 bilhões de pessoas, sendo que destas, 2 bilhões são obesas e outros 2 bilhões são subnutridas (PMA, 2017).

Os *Millennials* consideram que não existem várias “saúdes”, isto é, a saúde é só uma e corresponde ao ser humano, ao meio ambiente e aos animais (OMS, 2016). Como tal, os alimentos que detêm por base conceitos como o da ecossustentabilidade - dentro do qual o bem-estar do animal é salvaguardado - têm sofrido um incremento na sua procura. Denota-se, assim, a preocupação da população mundial pelo meio que as rodeia e o quão ele pode

influenciar a cadeia alimentar, quer positivamente, quer negativamente (Schubert e Schneider, 2016).

Com estas mudanças surgem novas tendências no consumo alimentar, com o consumidor, *player* bastante influente no mercado agroalimentar, a ditar as regras (Spaargaren e Oosterveer, 2010). Mais meticolosas, as escolhas recaem em produtos com um custo mais acessível, mas que possuam a mesma qualidade, pois muitas das vezes, os ingredientes para estes produtos são exatamente iguais aqueles utilizados nos produtos de preço mais elevado. Nesta lógica, surgem as marcas “brancas” que progressivamente estão a conquistar terreno no mercado. Aliada a esta tendência, aparecem áreas mais direcionadas para uma vida saudável e também para regimes nutricionais específicos (PortugalFoods, 2017). Cada vez mais surgem novos produtos, quer seja através da inovação de embalagens ou desenvolvimento de gamas que reúnem diversos componentes que se encontram na categoria de produtos com potencial benefício para a saúde humana como, por exemplo, os pré e probióticos e, também, os antioxidantes. Por fim, são ainda dadas outras classificações aos alimentos, como “natural”, “biológico”, “sem conservantes e edulcorantes”, “0% de lactose, de glúten e de gordura”, influenciando o consumidor na hora da compra (PortugalFoods, 2017).

É de salientar que os consumidores cada vez mais investigam e apreciam produtos que reúnem conceitos como: qualidade de vida, saúde, nutrição e bem-estar. Todavia, apesar de todas estas classificações, os mesmos não querem deixar de desfrutar do prazer social e gustativo da comida (PortugalFoods, 2017).

A adoção de algumas condutas alimentares, descritas anteriormente, não depende apenas do acesso à informação nutricional, mas é influenciada pelas preferências pessoais, comportamentos e atitudes em meio familiar, para não falar de fatores psicológicos e sociais. Está evidenciado por diversos autores que os hábitos alimentares no seio familiar durante a infância são de extrema relevância, uma vez que é uma etapa de formação a todos os níveis e, não sendo exceção à regra, são desenvolvidas afeições por padrões alimentares que permanecerão para a idade adulta. Isto é, uma nutrição adequada advém da educação alimentar que cada um teve, não só dentro do seu ambiente familiar, como na escola (Viveiros, 2012).

A população, em geral e atualmente, adotou um ritmo de vida acelerado. No que lhe concerne, e como compensação, tende também a procurar um estilo de vida saudável, destacando-se a influência das gerações mais novas nas tendências alimentares, sendo que 22,7 % da população portuguesa, ou seja, um total de 2,4 milhões de pessoas segue essa corrente, de acordo com Correia (2016).

1.2 Dieta mediterrânica

A OMS refere que a perda de anos de vida, ou a morte em países desenvolvidos, ou em desenvolvimento, deve-se essencialmente a três fatores associados a padrões alimentares que podem ser readaptados: abuso do álcool, excesso de peso, consumo insuficiente de fruta e de vegetais (Sarti *et al.*, 2017).

Na década de 60, Ancel Keys, através de estudos epidemiológicos constatou que a mortalidade por doenças crónicas, destacando-se os problemas DCV e o cancro, detinha uma taxa inferior nos países junto ao mar mediterrâneo em comparação com os do norte da Europa e dos EUA (Saldanha, 1999). Esta relação também já se tinha demonstrado nos séculos XVIII e XIX, pelo professor de medicina Thomas Mckeow, expondo como justificação uma alimentação mais regular e com um carácter nutricionalmente mais completo, ou seja, uma nutrição adequada (Flandrin *et al.*, 1998).

A dieta mediterrânica é modelo alimentar completo e nutricionalmente equilibrado, com inúmeros benefícios para a saúde e qualidade de vida. Este regime favorece o elevado consumo de frutas, vegetais, cereais pouco refinados, leguminosas, frutos secos e oleaginosos, peixe e lacticínios, de preferência queijo e iogurtes, um consumo baixo e pouco frequente de carnes vermelhas e doces e o azeite como principal fonte de gordura (Nemésio, 2013). O consumo de bebidas alcoólicas é moderado, sendo o vinho o mais utilizado, sobretudo às refeições (Abreu, 2017). A nível nutricional, esta dieta caracteriza-se por uma ingestão de ácidos gordos monoinsaturados, sobretudo de ácido oleico, fibras e substâncias de origem vegetal com um elevado potencial antioxidante.

Em concordância com a UNESCO (2013), esta é uma dieta que envolve uma série de competências, conhecimentos e rituais, em particular, o incentivo ao consumo de alimentos saudáveis (Covas *et al.*, 2015). Estas características assumem propriedades benéficas para quem segue este tipo de dieta, essencialmente no que diz respeito à redução de patologias oncológicas, doenças coronárias e crónicas. Diversos estudos epidemiológicos corroboram as vantagens de um regime nutricional como o da dieta mediterrânica, em que a população desta área apresenta um risco reduzido em desenvolver DCV, quando comparada com a dos EUA e de outros países da Europa (Capurso e Vendemiale, 2017; O'Kennedy *et al.*, 2017).

Estas vantagens devem-se à presença de macronutrientes e micronutrientes, sendo que os micronutrientes nos últimos anos têm sofrido uma investigação profunda, mas ainda longe de alcançar todo o conhecimento acerca dos mesmos. Deste grupo, fazem parte os carotenoides, as vitaminas, os minerais, as antocianinas, entre outros compostos

característicos de origem vegetal (Partidário *et al.*, 2014). Uma das características mais procuradas destes micronutrientes é a atividade antioxidante, que tem estado no foco da indústria alimentar para atrair o maior número de consumidores que procuram os benefícios desta propriedade, associada à prevenção de doenças degenerativas e genéticas, anti-envelhecimento e ao aumento da fertilidade. Assim, de modo geral, conclui-se que os micronutrientes assumem uma função protetora.

O tomate, parte integral das dietas mundiais, é um dos componentes chave na dieta mediterrânica, apresentando um largo consumo, além da riqueza em constituintes benéficos para a saúde (Leonardi *et al.*, 2000). Cerca de 85 % do licopeno da dieta humana é originário do tomate e dos seus derivados (Marques, 2017; Perveen *et al.*, 2015).

A população, em geral e atualmente, adotou um ritmo de vida acelerado. No que lhe concerne, e como compensação, tende também a procurar um estilo de vida saudável, destacando-se a influência das gerações mais novas nas tendências alimentares, sendo que 22,7 % da população portuguesa, ou seja, um total de 2,4 milhões de pessoas segue essa corrente, de acordo com Correia (2016).

1.3 Tomate

1.3.1 Origem e importância económica

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é um fruto da planta *Solanum lycopersicum* L, membro da família *Solanaceae*, à qual a batata, o pimentão e beringela também pertencem (Alves, 2009). É uma planta nativa da América do Sul e desde o século XVI que a sua produção se iniciou na Europa. Presentemente, a sua produção já se encontra generalizada ao ser utilizado em culturas gastronómicas distintas, vivenciadas em todo o mundo (Almeida, 2006).

Com as novas tendências alimentares, a população mundial tem consumido uma quantidade mais elevada de fruta e de legumes (Figura nº1), produtos fomentadores de saúde. O tomate não é exceção (OMS, 2002).

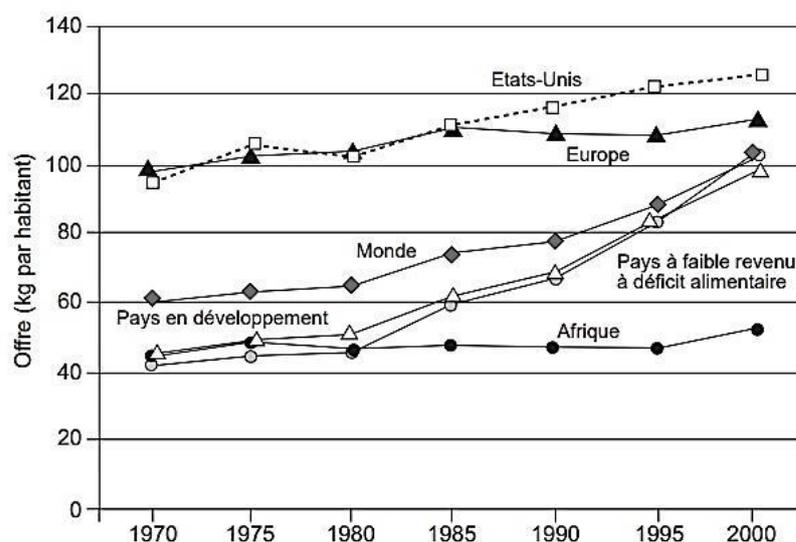


Figura nºI- Tendências de consumo de frutas e de legumes por habitante, 1970 a 2000 (OMS, 2002).

Nas últimas décadas, a produção de tomate sofreu um aumento brusco, tornando-a uma das culturas hortofrutícolas mais importantes em termos económicos, ocupando o segundo lugar mundial, com um valor a rondar os 150 milhões de toneladas (Friedman, 2013; Suárez *et al.*, 2007). Além disso, é um dos setores mais industrializados e competitivos, com a China a representar 26 % da produção mundial, ou seja, cerca de 33 milhões de toneladas (FAO, 2009). Os Estados Unidos da América (EUA) ocupam a 2ª posição no ranking mundial, seguidos pela Turquia, Índia, Egito, Irão, Itália e Espanha (FAO, 2009).

Esta expansão deve-se ao incremento deste fruto nas dietas porque, além do baixo custo, está disponível durante todo o ano e tem um sabor agradável (Abreu *et al.*, 2012). O seu consumo, todavia, não se fica apenas e só pelo alimento em fresco. Muito versátil, utiliza-se também através de formas processadas, como exemplo, molhos, sumos e produtos desidratados, entre outros (Viuda-Martos *et al.*, 2014).

Esta mudança de paradigma deve-se ao facto de as características apreciadas pelos potenciais compradores não só assentarem em questões visuais ou olfativas, mas, nos dias de hoje, na importância que estes apresentam para a saúde, traduzindo-se no crescimento da venda do produto para consumo em fresco.

Portugal, segundo os dados do Eurostat (2015), é o terceiro maior produtor de tomate da UE com 8 % de produção, ficando apenas atrás da Itália (36,3 %) e da Espanha (27,4 %). Sabe-se ainda que o consumo de tomate na EU é, cerca, de 35 quilos por habitante (Observador, 2016). A produção nacional de tomate destina-se ao consumo em fresco e para a indústria de transformação. A cultura para consumo em fresco (4,1 %) tem a sua maior concentração nas regiões do Ribatejo e oeste do Algarve, enquanto que, o tomate com destino

à indústria (40,8 %) centraliza-se no Ribatejo, vale do Tejo, no vale do Sorraia e nos regadios do Alentejo (Almeida, 2006).

Tabela nº1- Cultura de tomate em Portugal (INE, 2015).

| | 2012 | 2013 | 2014 |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Tomate de indústria | | | |
| Área cultivada (ha) | 13 895 | 14 006 | 17 210 |
| Produção (t) | 1 298 902 | 1 089 501 | 1 310 366 |
| Tomate fresco | | | |
| Área cultivada (ha) | 1 516 | 1 628 | 1 249 |
| Produção (t) | 95 515 | 97 339 | 89 169 |

O consumo de tomate em Portugal assenta sobretudo em quatro tipos: o alongado, o redondo, o *cherry* e o de rama, como é visível na figura nº2. O cultivo deste fruto pode ser feito em estufa, ocorrendo durante todo o ano ou ao ar livre, sendo que este método só permite a sua produção de junho a setembro na costa oeste, podendo prolongar-se até outubro na costa do Algarve (Codex Alimentarius, 2008; Costa et al., 2013).



Tomate chucha ou alongado



Tomate débora ou redondo



Tomate *cherry*



Tomate de rama

Figura nº2- Tipos de tomate mais consumidos em Portugal (Revista Business Portugal, 2017).

A sua indústria de transformação é a principal e a mais competitiva no setor hortofrutícola em Portugal. Ainda segundo o Eurostat (2015), o nosso país é o segundo maior exportador da Europa (cerca de 95 % de concentrado de tomate).

1.3.2 Composição nutricional

O tomate é um veículo de nutrientes e compostos bioativos, como os micronutrientes, entre eles a provitamina A e vitamina C (Choi *et al.*, 2014; Martins, 2006). A composição nutricional do tomate depende do tipo de amadurecimento, da produção, de fatores ambientais e agrícolas (fertilização e irrigação), possuindo um baixo teor de gordura, proteína e fibra, sendo constituído maioritariamente por água. Além da sua composição em vitaminas e minerais (Tabelas nº 2,3 e 4).

Tabela nº2- Valores para os macronutrientes e energia por 100 g de parte comestível (Adaptado de Almeida, 2006).

| | Água (%) | Energia (Kcal) | Proteína (%) | Gordura (%) | Hidratos de carbono (%) | Fibra (%) |
|----------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|------------------|
| Tomate verde | 93 | 23 | 1,2 | 0,2 | 5,1 | 1,1 |
| Tomate maduro | 94,5 | 18 | 0,9 | 0,2 | 3,9 | 1,2 |

Tabela nº3- Valores para as vitaminas por 100 g de parte comestível (Adaptado de Almeida, 2006).

| | Vitamina A (mg) | Tiamina (mg) | Riboflavina (mg) | Niacina (mg) | Ácido Ascórbico (mg) | Vitamina B₆ (mg) |
|----------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Tomate Verde | 385 | 0,06 | 0,04 | 0,5 | 23,4 | 0,08 |
| Tomate Maduro | 680 | 0,04 | 0,02 | 0,6 | 13,7 | 0,08 |

Tabela nº4- Valores para os minerais por 100 g de parte comestível (Adaptado de Almeida, 2006).

| | Potássio (mg) | Cálcio (mg) | Fósforo (mg) | Magnésio (mg) | Sódio (mg) | Ferro (mg) |
|----------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|
| Tomate Verde | 204 | 13 | 28 | 10 | 13 | 0,5 |
| Tomate Maduro | 237 | 10 | 24 | 11 | 5 | 0,3 |

O tomate é classificado como um fruto, apesar de não possuir a mesma doçura de outras frutas. Ao invés, esta doçura é compensada por um sabor ligeiramente amargo e ácido, possuindo semelhanças com os diversos vegetais, de tal modo que são preparados e cozinhados como tal. Este fruto é frágil e perecível. Como tal, e de acordo com a legislação, é realizada uma triagem para a eliminação dos defeituosos (podres, com fendas, pisaduras) antes da comercialização. Outro controlo é a calibragem obrigatória - com um mínimo e um máximo – de tamanho predefinido. Os frutos que estejam fora deste intervalo também são descartados, apesar da qualidade e da segurança deles estar garantida. Após a colheita, os tomates devem ser conservados em condições específicas, como a temperatura e/ou atmosfera modificada, divergindo para o tomate verde e o maduro (Almeida, 2006).

Tabela nº5- Condições de armazenamento recomendadas para os diferentes estados de maturação do tomate (Adaptado de Almeida, 2006).

| Condições de armazenamento | Tomate Verde | Tomate Maduro |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|
| Temperatura (°C) | 12 | 8-10 |
| Humidade relativa (%) | 90-95 | 90-95 |
| Duração do armazenamento | 1-3 semanas | 4-7 dias |
| O₂ (%) | 3-5 | 3-5 |
| CO₂ (%) | 2-3 | 3-5 |

De acordo com o referido, é compreensível que exista um desperdício alimentar bastante elevado deste fruto. Consequentemente, tem-se pesquisado e investido no reaproveitamento do tomate, possibilitando a oportunidade para esta indústria criar valor económico em algo que era descartado e também contribuir para a sustentabilidade alimentar. Como já se afirmou, dada a sua composição em compostos fenólicos e carotenoides, como

β -caroteno, licopeno, entre outros, a utilização do tomate na dieta quotidiana, conduz a benefícios para a saúde (Abreu *et al.*, 2012; Friedman, 2013).

O licopeno representa cerca de 80 % a 90 % do total dos carotenoides, existentes no tomate, tornando este alimento a principal fonte (Aherne *et al.*, 2009). Utilizando a correlação direta entre o consumo de tomate e a saúde, diversos estudos foram realizados e demonstraram a sua potencialidade ao ser utilizado como promotor da saúde, através da ingestão de compostos naturais, podendo ser combinado, ou não, com outros ingredientes (Friedman, 2013). Também tem sido possível verificar as inúmeras vantagens da introdução do licopeno em suplementos alimentares. Assim, foi aprovado pela EFSA, em 2006, o *Fruitflow*, com o objetivo de reduzir as DCV, entre outras patologias (O'Kennedy *et al.*, 2016). Além disso, a baixa concentração de sódio e a alta concentração em potássio presente neste fruto revela-se de extrema importância no controlo da pressão arterial e normal funcionamento das artérias, por causa do seu efeito vasodilatador. Concordante com diversos estudos, o seu sumo influencia o nível da glicose sanguínea, normalizando os seus valores após uma carga exagerada de exercício físico (Samaras *et al.*, 2014).

I.4 Capacidade Antioxidante

Os antioxidantes são moléculas que protegem de danos oxidativos que ocorrem biologicamente, podendo ser classificados como enzimáticos e não-enzimáticos.

Os enzimáticos encontram-se no primeiro nível de defesa contra os ROS, que ocorrem naturalmente no organismo e não são obtidos através da alimentação. Por outro lado, os antioxidantes provêm dos alimentos. Os compostos fenólicos ou polifenóis, advêm do metabolismo secundário das plantas e são importantes no seu crescimento e reprodução, uma vez que, exercem funções de defesa contra a radiação ultravioleta e organismos patogénicos, parasitas e predadores. Além disso, contribuem para a coloração e outras propriedades organolépticas das plantas, como o aroma, adstringência e ainda a estabilidade oxidativa (Dias *et al.*, 2014; Martins, 2018; Naczki e Shahidi, 2004).

Dentro deste vasto grupo são característicos mais de 8000 compostos e os mais abundantes na alimentação são os ácidos fenólicos e os flavonoides, apresentando uma proporção de 30 % e 60 %, respetivamente. Estas espécies orgânicas possuem, pelo menos, um anel aromático ao qual se ligam um ou mais grupos hidroxilos. A sua estrutura pode ser classificada numa simples molécula fenólica a polímeros bastante complexos com elevado peso

molecular. Estes fitoquímicos são antioxidantes potentes, pois, agem como intercetadores de radicais livres, reduzindo os efeitos do stress oxidativo. São também agentes quelantes de metais e retardadores de peroxidação lipídica, tornando-os essenciais numa dieta (Abreu et al., 2012; Alves, 2009; Oliveira et al., 2009; Martins, 2018). Todavia, a sua presença vai muito além da função antioxidante, apresentando outras propriedades biológicas, como anti-histamínica, anti-inflamatória, antibacteriana ou antiviral.

Os compostos fenólicos abrangem os ácidos fenólicos, os taninos, os estilbenos, as cumarinas e os flavonoides, apresentando-se divididos em dois grupos: os flavonoides e os não-flavonoides. Os primeiros, encontram-se distribuídos de maneira mais alargada pelos hortofrutícolas e apresentam uma estrutura química como C6-C3-C6, contrariamente aos outros, que detêm vários subgrupos, entre os quais o grupo dos ácidos fenólicos (Abreu et al., 2012; Alves, 2009). Os ácidos fenólicos encontram-se subdivididos em derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico (Martins, 2018; Martí et al., 2016; Oliveira et al., 2009). Sabe-se que mais de 30 % de compostos fenólicos introduzidos na dieta quotidiana advém da ingestão de sumos de fruta.

Os flavonoides também estão presentes nas plantas, e desempenham um papel importante a nível sensorial nos alimentos, a adstringência. Este grupo apresenta mais de 5000 compostos, e as maiores fontes são os frutos, vegetais, chá e o vinho, dado que sofre uma fermentação. Estes apresentam uma estrutura química com dois anéis aromáticos, anel A e B, unidos por três carbonos dando origem a um anel heterocíclico, anel C (Figura nº3). O anel C pode sofrer variações características que resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (Hollman e Katan, 1999). Os flavonoides, apresentam um papel importante na saúde do ser humano, estando-lhes atribuídas propriedades como a prevenção de inflamações, alergias, redução do risco de aterosclerose, da pressão arterial, da inibição plaquetária e da oxidação das LDL-colesterol. Estes acontecimentos são explicados pelo alto poder anti-radical livre destes fitoquímicos que protegem a camada lipoproteína interna das artérias (Abreu et al., 2012; Alves, 2009).

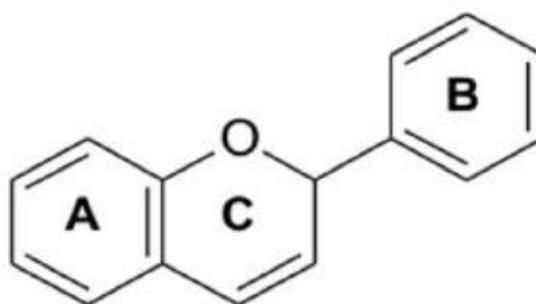


Figura nº3- Estrutura química dos flavonoides (Silva *et al.*, 2015).

O tomate apresenta polifenóis, embora em concentrações menores comparativamente aos carotenoides, como se pode observar na tabela nº 6 (Martí *et al.*, 2016).

Tabela nº6- Composição característica do tomate em carotenoides e polifenóis (adaptado de Martí *et al.*, 2016)

| Carotenoides | Concentração (mg/100g) | Polifenóis | Concentração (mg/100g) |
|--------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Licopeno | 7,8-78,1 | Chalcona Naringenina | 0,9-18,2 |
| Fitoeno | 1,0-2,9 | Rutina | 0,5-4,5 |
| Fitoflueno | 0,2-1,6 | Quercetina | 0,7-4,4 |
| β- caroteno | 0,1-1,2 | Ácido clorogénico | 1,4-3,3 |
| Luteína | 0,009 | Ácido cafeico | 0,1-1,3 |
| α-caroteno | 0-0,002 | Naringenina | 0-1,3 |

Nos últimos anos, os polifenóis têm alcançado grande importância no tomate, com vários estudos clínicos e epidemiológicos a sugerirem que a ingestão do mesmo e de produtos derivados promovem uma redução do risco em desenvolver DCV e cancro, uma vez que influenciam a transformação de células categorizadas como tumorigénicas, em células tumorais, *in vivo* e *in vitro*. Esta associação tem sido fortemente relacionada com o cancro da próstata. Assim, podem interagir de forma agonista com as terapias antitumorais, ditas de convencionais, sabendo que esse potencial difere consoante as capacidades quimioprotetoras dos polifenóis (Alves, 2009; Martí *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2015).

Estudos recentes comprovam que estes compostos bioativos são resistentes aos processos térmicos (Alves, 2009).

1.5 Carotenoides

1.5.1 Características físico-químicas e sua distribuição na Natureza

Os carotenoides são pigmentos naturais que compõem uma numerosa família de compostos lipofílicos, podendo variar na coloração entre o vermelho, laranja e amarelo. Estes pigmentos são nativos de inúmeros frutos e vegetais (Nobre *et al.*, 2012; Simões de Carvalho, 2012).

A sua formação ocorre pela junção de 8 unidades de isoprenos correspondente a uma cadeia poliolefínica de 40 átomos de carbono (tetraterpenos). Detém uma cadeia linear (acíclica), apesar de os compostos apresentarem nos seus extremos anéis de 6 carbonos, podendo exibir numa ou em ambas (β - caroteno) as extremidades. As duplas ligações que caracterizam a molécula são conjugadas em grande maioria na forma *trans* e são responsáveis pela absorção de luz cujos comprimentos de onda se situam na região do visível (Domingos, 2009).

A comunidade científica, atualmente, tem conhecimento de mais de 600 carotenoides naturais, catalogados como derivados da estrutura acíclica do licopeno ($C_{40}H_{56}$) por reações químicas, como hidrogenação, desidrogenação e ciclização (Rodriguez-Amaya, 2001; Viuda-Martos *et al.*, 2014). Os carotenoides dividem-se em dois grupos. O primeiro, onde os carotenos se designam por hidrocarbonetos por possuírem apenas átomos de carbono e de hidrogénio, traduzindo-se numa baixa polaridade, como por exemplo o licopeno. O outro grupo é o das xantofilas. São derivados oxigenados e possuem na sua estrutura química, pelo menos um átomo de oxigénio, como, por exemplo, a luteína (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). A natureza apolar destes compostos faz com que sejam insolúveis na água, mas solúveis em solventes orgânicos, como a acetona, álcool ou o éter de petróleo (Domingos, 2009).

Estes pigmentos encontram-se dispersos por toda a natureza, existindo em plantas e outros organismos. Todavia, só as plantas e os microrganismos é que conseguem sintetizar estas moléculas. Nos animais, a sua presença resulta de fontes externas, exclusivamente através da dieta (Raiola *et al.*, 2014). Nas plantas, a sua presença caracteriza-se por uma função primária, a captação de luz, durante a fotossíntese, além de exercer fotoproteção contra possíveis danos oxidativos. No ser humano, apesar da sua presença não ser essencial, estudos comprovam que a sua capacidade antioxidante está associada à prevenção de patologias (Trejo-Solis *et al.*, 2013).

1.5.2 Funções Biológicas no Ser Humano

Ao longo dos anos, diversos trabalhos têm permitido evidenciar os benefícios dos carotenoides para o ser humano. Uma dessas funções assenta na provitamina A, mais associada ao β -caroteno. Este carotenoide adquire atividade de vitamina A quando se dá a sua conversão na mucosa intestinal. É uma vitamina indispensável à manutenção adequada do sistema imunitário, visão, resistência a infeções, reprodução, entre outros (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Takeoka *et al.*, 2001). Também o poder antioxidante dos carotenoides apresenta um potencial benéfico para a saúde, pois, para além de promover a neutralização dos ROS, consegue ainda estimular o sistema anti-inflamatório. Assim, estes compostos bioativos assumem funções de proteção celular e ainda contra a foto-oxidação, combatendo os diversos radicais livres e espécies excitadas que podem causar danos irreversíveis no ADN e nos lípidos. Esta característica permite desenvolver uma “arma biológica” contra o cancro e outras doenças desencadeadas por essas moléculas, como a aterosclerose, as cataratas, a degeneração muscular ou a esclerose múltipla (Domingos, 2009).

1.6 Licopeno

O licopeno ($C_{40}H_{50}$) é o carotenoide mais abundante no plasma e tecidos do ser humano, descoberto em 1876 por Millardet (Raiola, *et al.*, 2015). A sua síntese acontece apenas nas plantas e microrganismos durante a fotossíntese pela ação do ácido mevalónico, posteriormente sujeito a uma série de processos, até chegar à forma final de licopeno. Possuindo uma elevada massa molecular (536,85 Da), é muito utilizado na indústria alimentar como corante natural (Domingos, 2009; Viuda-Martos *et al.*, 2014). O licopeno apresenta uma estrutura acíclica simétrica que contém 13 ligações duplas, das quais duas não são conjugadas e é apenas constituído por átomos de carbono e de hidrogénio, como já atrás se referiu. Esta estrutura é responsável pela sua cor, solubilidade em lípidos e pelo seu potencial antioxidante. A síntese deste carotenoide é influenciada por fatores ambientais, como a luz ou a temperatura, e agrícolas que vão desde da produção à maturação (Friedman, 2013; Hwang *et al.*, 2012; Rodriguez-Amaya, 2001). O teor de licopeno varia consoante o estado de maturação do tomate. Ou seja, quanto maior for o amadurecimento, maior será o teor de licopeno, independentemente da zona geográfica onde este é produzido (Friedman, 2013; Kozukue e Friedman, 2003; Rodriguez-Amaya, 2001). A abundância deste composto no tomate é responsável pela cor vermelha tão característica deste fruto, estando também presente em

outros frutos e vegetais, desenvolvendo uma coloração que pode variar entre o vermelho e o laranja (Barba *et al.*, 2006). O licopeno não tem atividade provitamina A, contudo, devido à sua estrutura química é definido como um dos melhores supressores biológicos de radicais livres (ROS). A sua capacidade antioxidante é duas vezes superior à dos outros carotenoides (α -tocoferol, α -caroteno, β -criptoxantina, β -caroteno e a luteína, por ordem decrescente) e cem vezes à da vitamina E (Horvitz *et al.*, 2004; Perveen *et al.*, 2015). No que diz respeito ao teor de licopeno, os valores dependem sempre da sua produção e do seu processamento. O tomate fresco contém em média cerca de 9,0 mg de licopeno/100 g, o molho de tomate tem 17 mg de licopeno/100g e o sumo 10 mg de licopeno /100g, por exemplo. A percentagem deste é também sempre superior na polpa comparativamente à pele (Perveen *et al.*, 2015) (Tabela nº7).

Tabela nº 7- Concentração dos diversos carotenoides no tomate e nos seus derivados (mg/100g) (adaptado de Perveen *et al.*, 2015).

| | Licopeno (mg) | Fitoflueno (mg) | Fitoeno (mg) | Luteína (mg) | β- caroteno (mg) | α- caroteno (mg) |
|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--|---|
| Tomate cru | 9,25 | 0,80 | 1,86 | 0,07 | 0,41 | 0,00 |
| Pasta de Tomate | 55,43 | 3,63 | 8,36 | 0,34 | 1,27 | 9,95 |
| Molho de Tomate | 17,96 | 1,27 | 2,95 | Vestígios | 0,45 | 3,37 |
| Purê de Tomate | 16,60 | 1,07 | 2,38 | 0,08 | 0,58 | 3,03 |
| Sumo de Tomate | 10,76 | 0,81 | 2,77 | 0,05 | 0,43 | 1,07 |

1.6.1 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade dos nutrientes nos alimentos é sujeita a um processo complexo que envolve a digestão, a absorção e distribuição pelos tecidos. No que diz respeito ao licopeno, a sua biodisponibilidade é influenciada pelo processamento, pelo alimento em si, pela forma química da molécula, pela quantidade de gordura, para além do processo de absorção e das interações que podem ocorrer com outros carotenoides (Burton-Freeman, 2014; Takeoka *et al.*, 2001). De acordo com diversos estudos, a biodisponibilidade parece estar

associada a um isómero que se forma devido à ação do calor. A presença deste no tomate e nos seus derivados varia entre 94 % e 96 % na forma predominante, isómero *trans*. Contrariamente, a forma que se encontra mais no soro e nos tecidos do ser humano é o isómero *cis*, sendo esta transformação favorecida pelo pH ácido do estômago (Marques, 2017), apresentando uma percentagem superior a 50 %, pois, detém propriedades físicas e químicas distintas da estrutura *trans*, possuindo uma maior solubilidade em matrizes lipofílicas (Costa et al., 2013; Viuda-Martos et al., 2014). A forma natural que se encontra no tomate, *trans*, apresenta uma reduzida absorção ao nível dos tecidos. Sabe-se que a absorção deste carotenoide é afetada pela ação de um processo térmico sobre o tomate, provocando a rutura da parede celular onde se encontra armazenado o licopeno, mais precisamente nos cromoplastos (Marques, 2017). É também influenciada pela quantidade de lípidos na refeição, porque durante a digestão e absorção desta molécula química, ocorre a sua separação dos restantes nutrientes, sendo incorporada nas micelas (Unlu et al., 2005). Quando se desencadeiam estes fenómenos, observa-se uma predisposição para ocorrer a isomerização do licopeno. Isto é, a configuração *trans* passa a *cis*, o que se traduz numa maior absorção por causa da sua elevada solubilidade nas micelas, para além da sua bioatividade ser maior que a da forma *trans* (Friedman, 2013). É de salientar que a concentração do licopeno no organismo não depende da ingestão diária de tomate e/ou seus derivados, porque a sua presença é de 12 a 33 dias (Bojórquez et al., 2013).

1.6.2 Evidências na saúde humana

Nos últimos anos, a comunidade científica tem-se focado na relação entre o licopeno e a saúde humana, devido à ação deste carotenoide sobre diversas patologias clínicas que assolam todos os anos milhões de pessoas pelo mundo (Martínez- Valverde et al.,2002).

De acordo com a OMS, a primeira causa de morte são os AVC's resultantes da genética, da obesidade, do consumo de álcool, do tabaco, do elevado colesterol LDL e da elevada pressão arterial. As partículas de colesterol de baixa densidade (LDL) são um fator de risco para o desenvolvimento de AVC, pois o aumento da oxidação destas lipoproteínas leva ao desenvolvimento aterosclerose. Todavia, um estudo de 12 anos realizado nos EUA constatou que havia uma ligação entre a redução da doença arterial coronária em mulheres e o consumo elevado de alimentos ricos em licopeno. Esta redução deve-se à ação inibitória da peroxidação das LDL que aportam um fator de risco para o desenrolar da aterosclerose (Kozakue e Friedman, 2003). Outro estudo, mas direcionado para o sexo masculino, teve

como amostra homens adultos hipercolesterolêmicos sujeitos diariamente a uma dose de 60 mg de licopeno durante três meses. O acompanhamento permitiu registrar uma redução em cerca de 14 % das LDL, ou seja, contribuiu para a diminuição de colesterol, devido à formação de complexos, tornando o colesterol insolúvel e, posteriormente, excretado nas fezes (Kozakue e Friedman, 2003).

Em segundo lugar, posiciona-se o cancro que em 2015 matou mais de 8,8 milhões de pessoas (OMS, 2015). Em conformidade com alguns especialistas, a alimentação é preponderante na prevenção de doenças, indo ao encontro com o descrito em vários estudos epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro*, onde se evidencia uma relação entre o licopeno e o cancro do pulmão, esófago, mama, útero, bexiga e próstata (Barba *et al.*, 2006). Esta causalidade (alimentação-cancro), já estudada em 1981 por Doll e Peto, demonstrou que em cerca de 35 % dos casos, uma alimentação inadequada interferia na incidência de cancros (Saldanha, 1999). De acordo com o atrás referido, o licopeno é uma molécula que assume um papel importantíssimo na inibição da proliferação celular, da mutagénese e no aumento da resposta imunológica (Migliori *et al.*, 2012). Existem ainda outros estudos que evidenciam uma possível redução até 32 % do risco em desenvolver cancro dos pulmões em não fumadores (Costa *et al.*, 2013). Em 2004, uma meta-análise publicada evidenciou que o elevado consumo de tomate reduzia o desenvolvimento de cancro da próstata (Perveen *et al.*, 2015), relação corroborada por outro estudo que aponta essa redução em cerca de 83 % (Raiola *et al.*, 2014). O consumo de licopeno através da ingestão de tomate e de derivados, para além de ter uma relação na redução de patologias como AVC e cancro (Gupta *et al.*, 2011), também contribuiu para diminuir o *stress* oxidativo e a inflamação pós-prandial, bem como demonstrou uma ação de extrema importância na conservação do ADN (Burton-Freeman, 2012).

Shi e colaboradores (2002), divulgaram um estudo onde eram demonstrados indícios da possibilidade de o licopeno ser capaz de estimular o sistema imunitário do ser humano, tendo uma ação protetora sobre o vírus VIH.

1.7 Soro de leite

O soro de leite é um dos principais subprodutos da indústria dos lacticínios, representando o líquido de cor amarelo-esverdeado, de aspeto turvo e de sabor variável, alternando entre o ácido e o doce. Este subproduto que se obtém de separação durante o fabrico do queijo, representa cerca de 90 % do volume de leite usado na produção de queijo (Tavares *et al.*, 2012; Borralho, 2015). Relativamente à sua composição, a maior concentração recai sobre a água com valores a rondar entre os 93 % -94 %, gordura (0,1 % - 0,5 %), lactose (4,5 % - 5,0 %), proteínas (0,8 % - 1,0 %) e minerais (0,5 % - 0,7 %). Contudo, a constituição do soro pode variar consoante o tipo de queijo produzido, da espécie produtora de leite (Azevedo, 2015; Slavov, 2017). A tabela nº8 refere-se à caracterização do soro de leite fabrico de queijo (lactossoro).

Tabela nº8- Composição do soro de leite (Adaptado de Slavov, 2017).

| Produto | Matéria seca (%) | Gordura (%) | Proteína (%) | Lactose (%) | DQO* (g/kg) | DBO* (g/kg) |
|-------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Lactossoro | 6,0-6,2 | 0,05-0,20 | 0,75-1,00 | 4,5-4,8 | 72-77 | 51,6-55,9 |

* DQO = demanda química de oxigénio *DBO= demanda bioquímica de oxigénio

Este subproduto representa um sério problema para o meio ambiente por causa das suas características, observando-se uma elevada carga orgânica de difícil biodegradação. Ou seja, os microrganismos não conseguem usá-lo diretamente como fonte de energia, porque possui uma demanda bioquímica de oxigénio que pode variar entre os 30 000 ppm a 50 000 ppm (Borralho, 2015; Gouveia, 2016). Esta característica também impossibilita a condução deste efluente para estações de tratamento comum. Em termos mais concretos, 100 kg de soro líquido têm um potencial poluente que equivale aos detritos produzidos num só dia por 40 a 45 pessoas (Pereira *et al.*, 2014).

No último século, esta indústria dos lacticínios tem sofrido um crescimento com valores anuais de 2,8 %, logo é subproduzida uma elevada quantidade de soro, uma vez que, por cada quilograma de queijo obtém-se em média nove litros de soro. Este crescimento, numa realidade nacional, demonstra um total de 1,3 %, ocupando a 15ª posição no volume de leite de vaca recolhido, como se pode ver na figura nº4. Estes dados corroboram, assim, os 20 % de consumo de lacticínios pela população portuguesa (IAN-AF, 2017).

O consumo de queijo é algo enraizado na dieta mediterrânica há muitos anos, e que nos últimos tempos sofreu inovação na sua produção. Esta adaptação veio permitir o aumento da produção, uma média de 3,2 %, para satisfazer as necessidades de consumo, isto é, cada português consome cerca de 11,7 Kg de queijo por ano (INE, 2016).

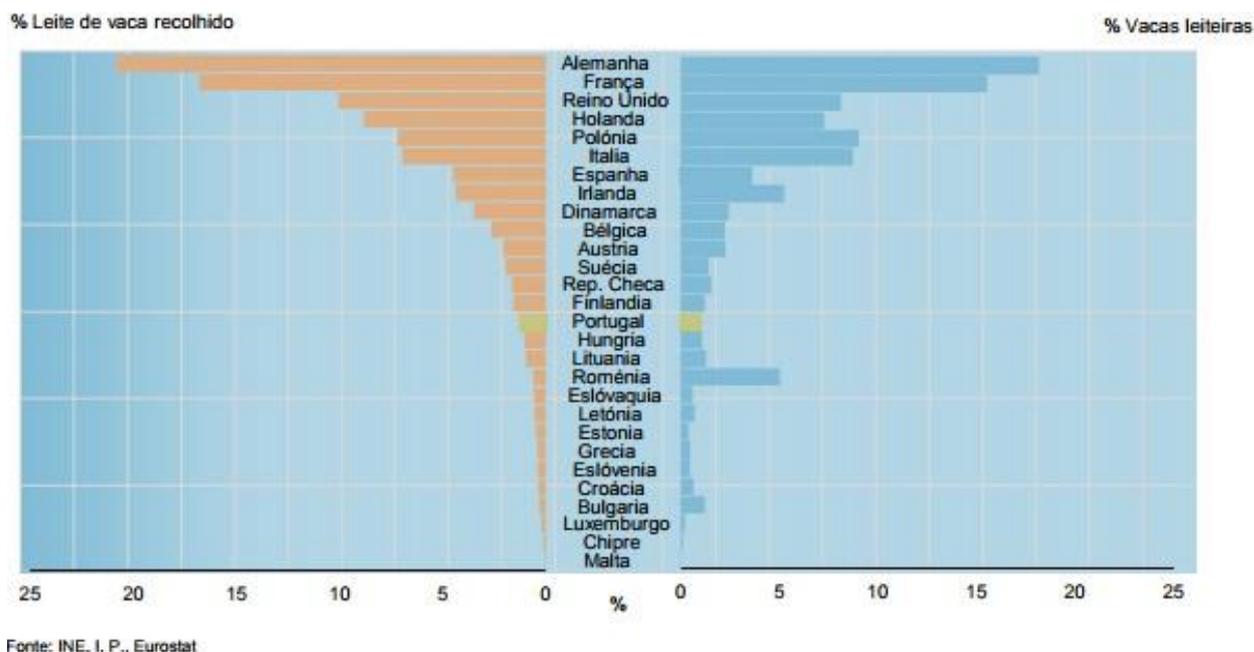


Figura nº4- Dados da recolha de leite de vaca e do efetivo leiteiro na União Europeia em 2015 (INE,2016).

Fazendo uma extrapolação dos dados anteriormente apresentados, é fácil perceber que o volume deste subproduto é bastante significativo, caracterizado pelo seu potencial valor nutricional e, simultaneamente, pela sua carga poluente, sendo indispensável criar soluções de aproveitamento e de valorização para o soro de leite.

No que diz respeito ao destino deste subproduto, soro de leite, sabe-se que 42% das queijarias têm licença para rejeição das águas residuais produzidas, 13% têm indicação para efetuar descarga no solo, 62% têm indicação de descarga é realizada na linha de água e 6% foram indicadas para descarga no coletor municipal (Costa, 2011), esta informação está de acordo com a disponibilização de dados por parte das queijarias instaladas no país à CCDR. No fundo, Portugal tem capacidade para potenciar financeiramente uma melhor rentabilização do soro de leite.

O soro de leite apresenta um elevado valor nutritivo, pois retém cerca de 60 % dos nutrientes do leite e detêm propriedades funcionais (Azevedo et al., 2014). As proteínas do soro caracterizam-se pela alta atividade biológica e pela elevada digestibilidade, uma vez que, são ricas em aminoácidos essenciais (Henriques et al., 2011).

Este excedente é utilizado no enriquecimento de alimentos destinados, tanto para a alimentação humana (iogurtes, queijo e derivados), como para a animal. Na forma de soro em pó, este pode ser incorporado na alimentação de bovinos e ovinos. Devido às suas proteínas, este pode ser utilizado pelas indústrias, farmacêutica e alimentar, no fabrico de suplementos alimentares ou produtos enriquecidos em proteínas (Borralho, 2015).

Quando o soro de leite é processado, através da tecnologia adequada, a ultrafiltração, obtêm-se dois produtos que apresentam uma composição diferente. De um lado, o concentrado líquido de proteína do soro (CLPS) e do outro, o permeado de ultrafiltração (PUF). Esta técnica assenta na diferença de pressão entre os dois lados da membrana que retém todos os componentes do soro de leite que apresentem um elevado peso molecular, como está esquematizado na figura nº5. Assim, ficam retidas as proteínas e a gordura. No primeiro constituinte (CLPS), a concentração de proteínas varia entre os 25 % a 80 %. Este processo permite que a água, a lactose, pequenos péptidos e algumas vitaminas hidrossolúveis atravessem a membrana, formando o permeado da ultrafiltração (Pereira *et al.*, 2014).

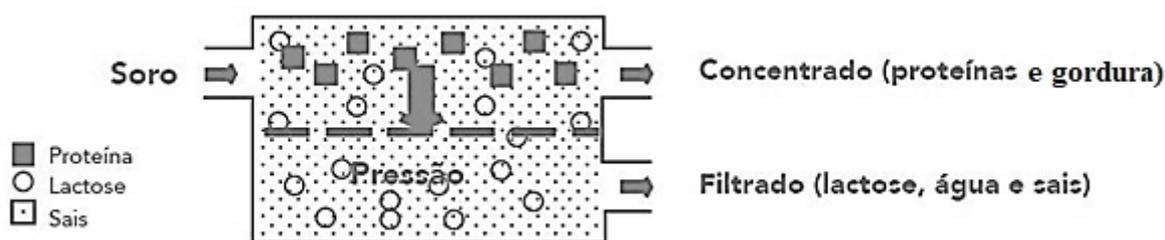


Figura nº5- Esquema do processo de ultrafiltração do soro de leite (Zuñira *et al.*, 2004).

Durante décadas, o soro foi dispensado pela indústria alimentar e somente na década de 70 é que a comunidade científica demonstrou interesse no soro de leite, uma vez que, as proteínas provenientes do concentrado apresentam benefícios para a saúde humana. Estas apresentam excelentes propriedades funcionais, como a alta solubilidade num largo espectro de pH, a capacidade emulsionante e gelificante, entre outras. Concluindo, o concentrado de proteínas de soro pode apresentar efeitos benéficos ao nível do sistema imunológico, cardiovascular, nervoso e gastrointestinal (Díaz *et al.*, 2009).

1.7.1 Subproduto como fonte de compostos bioativos

As proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos. Estas detêm alta qualidade nutricional e propriedades funcionais, podendo dar origem a uma gama variada de produtos.

Das inúmeras proteínas do soro de leite (Tabela nº9), a β -lactoglobulina é a mais representativa (50 %-60 %) neste produto, seja ele de origem bovina, ovina ou caprina (Tavares *et al.*, 2012). Os estudos não lhe atribuem um papel biológico específico, mas a sua ingestão contribui para um aporte de minerais, de lípidos, de vitaminas lipossolúveis porque não é produzida pelo organismo humano, sendo atribuída uma importância acrescida à sua introdução na nutrição infantil (Artym *et al.*, 2013). Também tem uma ação benéfica contra o cancro do colón (Díaz *et al.*, 2009). A α -lactoalbumina no soro encontra-se entre os 15 %-20 %, e é a segunda proteína com maior expressão neste produto. Caracteriza-se pela fácil e rápida digestão, exercendo uma atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (Haraguchi, 2006).

Tabela nº9- Características das proteínas presentes no soro de leite (Adaptado de Azevedo, 2015).

| Proteínas do soro | Massa Molar (kg/mol) | pH_{isoeletrico} | Fração mássica (%) |
|--|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| β-lactoglobulina | 36,6 | 5,1-5,4 | 50-60 |
| α-lactoalbumina | 14,2 | 4,2-4,5 | 15-20 |
| Soroalbumina (BSA) | 69 | 4,7-5,1 | 5-6 |
| Lactoferrina | 77-80 | 8,6-9,2 | $\leq 1,5$ |
| Lactoperoxidase | 77-80 | 9,0-10,2 | $\leq 0,5$ |

As proteínas são constituídas por uma grande quantidade de aminoácidos essenciais, onde se destaca a leucina, que tal como a β -lactoglobulina não é produzida pelo ser humano. A leucina é caracterizada por promover a estimulação da síntese proteica, desempenhando funções importantes no processo de crescimento muscular, aliado à redução do catabolismo, traduzindo-se no aumento da massa muscular e diminuição da acumulação de gordura corporal (Borralho, 2015). Contudo, encontramos outras funções, tais como a atividade antioxidante, antimutagénica, imunidade passiva, características de outras proteínas (Brimelow *et al.*, 2017).

O leite da espécie bovina, desde sempre assumiu um papel de destaque na nutrição do ser humano, principalmente por ser uma ótima fonte de cálcio. As proteínas de soro também assumem um papel importantíssimo no que diz respeito aos ossos, uma vez que, estas promovem a proliferação e diferenciação de osteoblastos, originando um aumento na densidade mineral óssea, ou seja, estimulam a formação óssea (Hinrichs, 2004).

Também se comprovou, na população que sofre diabetes *mellitus* do tipo II², que a ingestão de proteínas antes das refeições permite uma redução da glicemia pós-prandial, estimulando a secreção da insulina. Das diversas proteínas, as do soro de leite foram caracterizadas como as mais eficazes por serem ricas em leucina e aminoácidos de cadeia ramificada, promotores da secreção de insulina. Além disso, estas proteínas são de uma rápida absorção e de elevada biodisponibilidade (Almario *et al.*, 2017; Brimelow *et al.*, 2017).

Em oposição, temos o permeado da ultrafiltração, composto pelo principal hidrato de carbono presente no leite, a lactose. No soro de leite, este hidrato representa cerca de 70 % dos sólidos totais, tornando-o um dos constituintes mais importantes e determinantes nas propriedades dos produtos. A lactose é um dissacarídeo, constituído por glicose e galactose, dois açúcares essenciais que se apresentam como unidades básicas de energia necessárias para as atividades e manutenção do metabolismo celular. O nosso organismo depende destes para sobreviver. A lactose tem inúmeras aplicações e é amplamente utilizada na indústria alimentar e farmacêutica (Azevedo, 2015).

De salientar que o permeado é constituído por pequenos péptidos bioativos que exercem funções essenciais ao nível do sistema cardiovascular, nomeadamente em relação à hipertensão arterial (Hinrichs, 2004; Pereira *et al.*, 2014), pois, estes péptidos, executam uma ação inibitória sobre a enzima conversora da angiotensina assumindo um papel no sistema renina-angiotensina. Caso contrário, a angiotensina, iria exercer a sua função ao catalisar a formação de um vasoconstritor (angiotensina II) e inibiria a bradicinina (vasodilatador). Pins e Keenan (2004) estudaram e avaliaram este efeito, verificando que após a ingestão destes pequenos péptidos havia uma redução significativa da pressão sanguínea. Ao fim de 8 semanas, estes investigadores verificaram que o consumo destes péptidos provocava uma elevação na concentração de HDL, uma diminuição de triglicéridos e, conseqüentemente, redução do risco de ataque cardíaco (Haraguchi, 2006). Além disso, é constituído por sais minerais, maioritariamente potássio, sódio, magnésio e cálcio. No que diz respeito às vitaminas presentes, as que se encontram em maior quantidade são a vitamina A, C e B12 (Roca, 2009).

Atualmente, a procura por alimentos que não sejam compostos por lactose é constante e cada vez maior. Este fator deve-se ao elevado número de pessoas intolerantes a este hidrato de carbono. Estudos epidemiológicos demonstram que este diagnóstico é comum em adultos de todo o mundo (cerca de 75 %). No que diz respeito aos ocidentais, onde se encontram os portugueses, os valores de intolerância recaem em cerca de 90%. Este fenómeno de

² Diabetes *mellitus* tipo II- é uma doença endócrina crónica, caracterizada por hiperglicemia que resulta da deficiência absoluta ou relativa de insulina. Na diabetes tipo II há secreção anormal de insulina devido à resistência periférica e representa 85 %-90 % dos indivíduos com diabetes. (APDP)

intolerância é causado pelo declínio da atividade da enzima intestinal β -galactosidase com o aumento da idade. Esta enzima é responsável pela hidrólise da lactose nos dois monossacarídeos e ocorre a nível intestinal (Mattar, 2010). Assim, quem tem este tipo de diagnóstico, manifesta sintomas clínicos como diarreia, inchaço, flatulência e dores abdominais, sendo que o grau de severidade é proporcional à quantidade de lactose consumida.

1.8 Desperdício da indústria alimentar vs ambiente

No mundo, o consumo e a abundância contrastam com a fome e a pobreza, “come-se e desperdiça-se muito” (Baptista *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2015), com a tendência da globalização a promover alterações no mercado agroalimentar. Consequentemente, existe um aumento da produção de alimentos e também uma maior diversidade de produtos, efeito do incremento na procura por parte dos consumidores. Este fenómeno implica mais desperdícios alimentares nas diversas etapas, porque os processos de produção são mais longos, desvalorizando cada vez mais a aproximação produtor-consumidor, processamento, comercialização e consumo final (Baptista *et al.*, 2012). O desperdício alimentar é definido como a perda em massa ou em qualidade dos alimentos. Isto é, alimentos que são eliminados ou utilizados para outros fins, apesar de se manterem seguros e nutricionalmente adequados para o consumo humano (Hanchar, 2017).

A temática do desperdício alimentar é reconhecida como um problema social com impacto nutricional, ambiental e económico. Este problema tem ganho uma atenção especial por parte dos governos, das organizações não-governamentais e governamentais, bem como, dos principais sectores envolvidos na cadeia de aprovisionamento³(Moreira, 2012). Nas reuniões entre as referidas entidades, figuram prioridades como aplicação de medidas de gestão eficiente dos recursos ou a importância de campanhas de consciencialização junto da população mundial. Segundo a FAO, apesar de se evidenciar um aumento da produção alimentar, a sua distribuição é desigual, existindo 815 milhões de pessoas em todo o mundo a passar fome. Sabe-se que um terço dos alimentos produzidos para o consumo humano, equivalente a 1,3 biliões de toneladas, são desperdiçados anualmente (FAO, 2017).

A sustentabilidade alimentar tornou-se assim uma preocupação primordial, pois trata-se de considerar um alimento próprio para consumo. Em 2008 nos EUA, 222 milhões de

³ Aprovisionamento – é um processo que inclui aspetos que vão desde da relação entre fornecedores e empresas, para além da administração e negociação. Este conceito é mais vulgarmente conhecido por abastecimento.

toneladas de alimentos produzidos para o consumo humano sofreram perdas de 26 %, ou seja, 57,1 milhões de toneladas perderam-se na distribuição e consumo (Baptista *et al.*, 2012). A FAO calcula que, todos os anos, cerca de um terço dos alimentos produzidos para o consumo humano sofram perdas ou desperdício, representando 1 300 milhões de toneladas. Nessa mesma publicação, é discriminado que nos países industrializados o valor mais elevado de desperdício ocorre na distribuição e no consumo final. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, os níveis de desperdício figuram ao início da cadeia, nas fases de colheita e pós-colheita, processamento e armazenamento (Royte, 2014). Referindo números, nos países desenvolvidos são desperdiçados 670 milhões de toneladas (Royte, 2014) e as maiores percentagens de perda assentam nas frutas e legumes (Baptista *et al.*, 2012). Um estudo realizado pela CE identifica um desperdício total de 89 milhões de toneladas em resíduos alimentares nos 27 países membros da UE, correspondendo a 179 kg por habitante, oscilando entre os diversos países, sendo que 34 % do desperdício ocorre em casa dos consumidores (Hanchar, 2017; Moreira, 2012). A figura nº6, demonstra o histórico do desperdício alimentar na União Europeia em 2010.

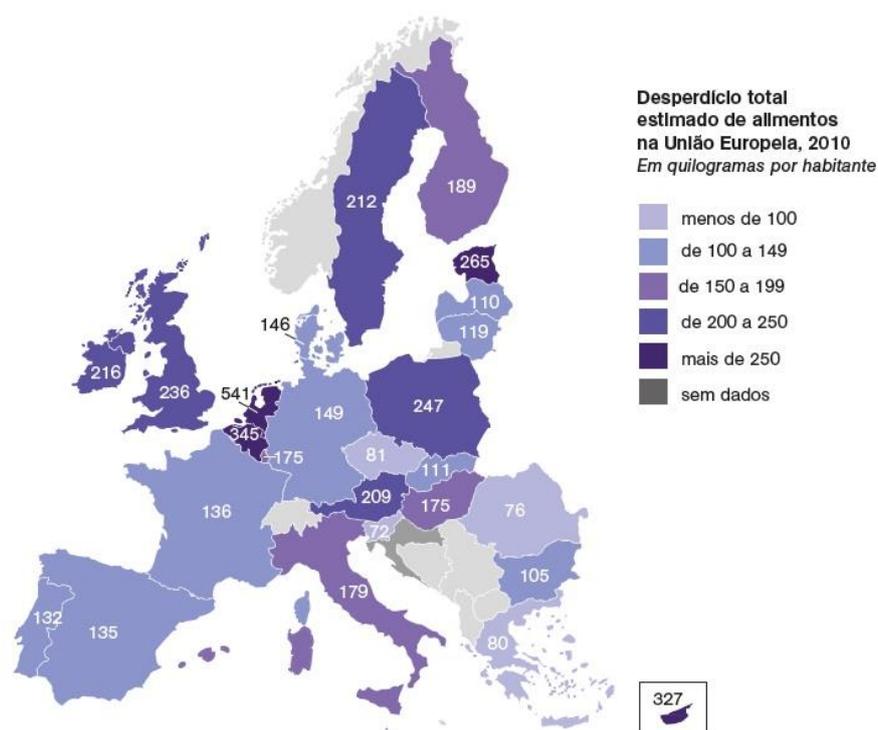


Figura nº6- Desperdício total estimado de alimentos na União Europeia em 2010, Kg/ habitante (Royte, 2014).

Portugal também não foge à regra no desperdício alimentar, apesar não estar categorizado nos países com níveis mais elevados, cifrando-se numa taxa de 132 kg/habitante. No total, apresenta um milhão de toneladas de perdas alimentares com 17 % a acontecerem

antes de chegarem à mesa do consumidor, segundo o Projeto de Estudo e Reflexão sobre Desperdício Alimentar (CES/UNL) (Governo de Portugal, 2014).

Ao abordar esta problemática, concomitantemente falamos de poluição. Em 2014, a FAO revelou que as emissões de CO₂ vindas do sector agroalimentar aumentaram em média 14 % em 3 anos, ou seja, 20 milhões de toneladas em CO₂ (Bernstad, 2016; Moreira, 2012). Alguns autores estimaram que uma redução para metade do desperdício alimentar na Europa levaria a uma diminuição em 5 % das emissões totais dos gases de efeitos de estufa (GEEs) (Hanchar, 2017). Este impacto ao longo da cadeia de aprovisionamento é inevitavelmente superior, e as maiores contribuições recaem nos subprodutos: 34 % dos cereais; 21 % da carne; e 21 % dos vegetais (Bernstad, 2016).

O tomate tem a maior produção na categoria hortofrutícola, tanto em Portugal, como a nível mundial, contabilizando-se cerca de 50 mil toneladas desperdiçadas, com impacto negativo no meio ambiente, poluindo não só os solos, mas também o ar e a água, uma vez que, a sua degradação ocorre a céu aberto (Borrvalho, 2015). Apesar da indústria do tomate apresentar produtos bastante diversificados, ainda sobram numerosos subprodutos do processamento (pele e grainhas), para os quais o tratamento é bastante dispendioso com consequências na economia (Viuda-Martos *et al.*, 2014). Em Portugal, estes desperdícios representam cerca de 18 % só no campo (Baptista *et al.*, 2012). A figura nº7, é ilustrativa das perdas alimentares, desde da produção ao consumo, na cadeia dos hortícolas.

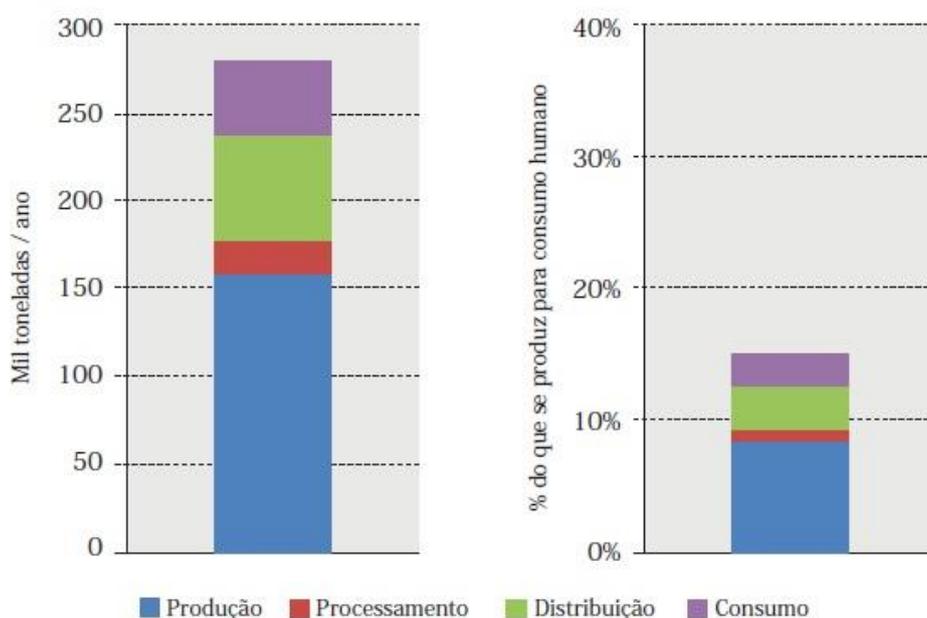


Figura nº7- Perdas alimentares em cada fase da cadeia dos hortícolas (Baptista *et al.*, 2012).

Mas não são só os frutos e vegetais que contribuem para a poluição, pois, os subprodutos oriundos da indústria queijeira têm um potencial bem mais negativo. O soro de leite proveniente da manufatura do queijo nos últimos 30 anos tem estado na ribalta como um poluente de águas e solos, influenciando a cadeia alimentar, tendo em consideração que é um produto bastante bioacumulável (Bernstad *et al.*, 2016).

O aumento do consumo de laticínios tem-se desenvolvido, tanto em países cujo consumo já estava enraizado, como em países que se tornaram emergentes no uso destes produtos que não faziam parte da cultura gastronómica (Borrvalho, 2015). Esta crescente procura por queijo conduz inequivocamente a uma maior sobreprodução de soro de leite que, conseqüentemente, se traduz no aumento da poluição das águas.

Durante anos, a principal preocupação relativamente à água assentava nas condições básicas de higiene, como tal, os recursos hídricos foram, frequentemente, utilizados como recetores de efluentes industriais, agrícolas e domésticos. Este fenómeno de libertação nas águas ocorre porque não existe uma solução mais viável para as empresas desta indústria, uma vez que, o tratamento é demasiado dispendioso (Slavov, 2017). Este custo deve-se ao facto de o soro de leite apresentar uma elevada carga orgânica, não permitindo a sua biodegradação, possibilitando o desenvolvimento de camadas espessas de algas, num fenómeno designado de eutrofização. Este acontecimento impossibilita a entrada de luz e, conseqüentemente, a realização da fotossíntese pelos organismos que habitam aquelas águas, originando um aumento de bactérias e microrganismos decompositores. Por sua vez, os microrganismos consomem o oxigénio presente na água o que promove a morte da flora e da fauna residente das áreas afetadas (Azevedo *et al.*, 2014; Slavov, 2017). Como tal, as águas residuais da indústria queijeira não podem ir para uma estação de tratamento dita normal, como exposto no anexo I, pois apresentam concentrações muito superiores em todos os parâmetros, quando comparadas com as águas residuais urbanas (Costa, 2011). Logo, as águas residuais resultantes da indústria queijeira têm de ser conduzidas para estações de tratamento residuais específicas (Azevedo *et al.*, 2014). Caso as águas residuais desta indústria, que apresentam na sua composição soro de leite, não sejam encaminhadas devidamente, irá desencadear-se o desequilíbrio dos ecossistemas (Vale, 2009). Este desequilíbrio terá nefastas conseqüências para todos os seres vivos (Costa, 2009).

Tabela nº10- Valores do fabrico de queijo desde 1986 a 2015 (INE, 2016).

| | Produtos frescos | Dos quais: | | |
|-------------------------------------|------------------|------------------------|----------|--------|
| | | Produtos lácteos em pó | Manteiga | Queijo |
| 1986 | 730 145 | 18 679 | 9 000 | 30 124 |
| 1987 | 780 558 | 16 900 | 8 000 | 32 997 |
| 1988 | 793 532 | 17 522 | 10 320 | 38 242 |
| 1989 | 830 741 | 22 557 | 12 090 | 41 091 |
| 1990 | 853 658 | 25 256 | 15 450 | 44 137 |
| 1991 | 877 317 | 25 597 | 15 860 | 46 915 |
| 1992 | 884 565 | 25 109 | 16 580 | 47 783 |
| 1993 | 886 297 | 22 950 | 16 705 | 47 312 |
| 1994 | 898 991 | 23 163 | 16 921 | 50 287 |
| 1995 | 889 673 | 25 891 | 19 380 | 52 324 |
| 1996 | 909 171 | 16 592 | 19 251 | 52 889 |
| 1997 | 975 239 | 20 644 | 21 154 | 54 062 |
| 1998 | 1 044 795 | 17 968 | 19 566 | 56 553 |
| 1999 | 1 093 745 | 20 736 | 24 707 | 63 601 |
| 2000 | 1 078 625 | 19 894 | 24 599 | 66 754 |
| 2001 | 1 036 807 | 17 024 | 24 524 | 67 486 |
| 2002 | 1 043 509 | 21 411 | 27 435 | 68 012 |
| 2003 | 1 073 240 | 18 660 | 26 252 | 66 351 |
| 2004 | 1 097 025 | 17 935 | 25 977 | 66 926 |
| 2005 | 1 164 528 | 15 216 | 26 971 | 66 282 |
| 2006 | 1 169 864 | 16 421 | 28 694 | 66 033 |
| 2007 | 1 141 676 | 14 418 | 27 695 | 69 117 |
| 2008 | 1 102 107 | 17 621 | 30 355 | 66 980 |
| 2009 | 1 056 440 | 20 856 | 29 263 | 65 071 |
| 2010 | 1 057 790 | 18 576 | 27 182 | 68 883 |
| 2011 | 1 075 966 | 16 530 | 27 667 | 72 240 |
| 2012 | 1 080 014 | 17 348 | 28 446 | 71 883 |
| 2013 | 1 064 404 | 14 639 | 25 736 | 69 947 |
| 2014 | 1 058 085 | 19 826 | 28 114 | 73 370 |
| 2015 | 964 411 | 27 496 | 32 285 | 73 132 |
| Média 2010/2015 | 1 050 112 | 19 069 | 28 238 | 71 576 |
| Média 1986/2015 | 990 431 | 19 781 | 22 206 | 58 559 |
| Taxa média variação anual 2010/2015 | -0,3 | 1,4 | 0,6 | 0,2 |

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), a produção de queijo em Portugal, entre 1986 e 2015, sofreu um aumento de 4 % para 7,2 % do total de leite produzido, o que reflete um total de 73 132 toneladas de queijo produzido em 2015, como está ilustrado na tabela nº10. Esta produção, apenas diz respeito ao soro do leite de vaca, ficando de lado o soro dos queijos de ovelha e cabra, e é estimada em cerca de 659 milhões de litros de soro (INE, 2016).

Com o aumento do crescimento populacional, o volume global de desperdício alimentar na europa, em 2020, atingirá valores que rondam os 126 milhões de toneladas, representando um acréscimo em cerca de 40 %. Consequentemente, o PE apelou à introdução de medidas preventivas, para que até 2025 o desperdício alimentar sofresse uma redução em mais de metade, proclamando o ano 2014 como o “ano europeu contra o desperdício alimentar”. Portugal também se mostrou sensível e preocupado por este tema, levando-o à

Assembleia da República que proclamou o ano 2016 como o “ano nacional de combate ao desperdício alimentar” (Hanchar, 2017; Moreira, 2012).

Esta temática é bastante desafiante para as indústrias, uma vez que, a redução do desperdício ao longo da cadeia de aprovisionamento é de extrema importância. As empresas procuram otimizar os processos, aumentar o lucro e com este a competitividade, sendo que muitas das vezes para gerar lucros extras, têm de ser ousadas e criar soluções que valorizem os seus subprodutos, como no caso do tomate e do soro de leite.

Capítulo II- Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo reaproveitar recursos que são subprodutos da indústria agroalimentar que detêm todas as condições de qualidade e segurança para serem utilizados no desenvolvimento de duas bebidas alimentares.

Para estas bebidas aproveitou-se um hortofrutícola, o tomate, dado à problemática premente do desperdício alimentar que se vive neste setor, uma vez que, a produção vegetal a nível mundial estima um valor excedente de 100 triliões de quilogramas (Baeta, 2014). Em Portugal, na produção de tomate existe um desperdício de 10 % a 20 % por não reunir as condições legisladas para a sua utilização na indústria ou venda a fresco (INE, 2014). Como referido anteriormente, o tomate é o fruto que tem maiores valores de desperdício por ser perecível, sujeito a danos físicos e por não respeitar o calibre estipulado. Além disso, outros danos ocorrem na fase de armazenamento, quando não executado nas condições devidas, traduzindo em média 1 100 000 toneladas desperdiçadas por ano, a nível global (Roca, 2009). Os subprodutos que resultam deste hortofrutícola apresentam um elevado valor nutritivo, e a sua valorização tem um alto potencial para o desenvolvimento sustentável deste sector. Devido às características anteriormente mencionadas, estes subprodutos tinham como destino a alimentação animal, uma vez que, além de deter um elevado teor em fibra, têm um teor de licopeno bastante atrativo (Valente, 2015). Assim, o objetivo passa por recolher a fruta que não possuiu as características exigidas para a comercialização e criar valor acrescentado ao formular novos produtos (Domingos, 2009).

No que diz respeito ao aproveitamento do outro subproduto, o soro de leite, a legislação limita, mas não proíbe a sua deposição no meio ambiente e, como tal, já é sujeito a alguns tratamentos apesar de serem ineficazes ou não contribuírem para uma valorização rentável. Contudo, os concentrados de proteínas de soro têm ganho mais atenção pelo seu valor nutricional e a sua comercialização tem ganho terreno no mercado de produtos secos ou desidratados. Com estas características, torna-se indispensável o aproveitamento do soro, ao invés de ser descartado, diminuindo a poluição e criando produtos com bastante qualidade para consumo humano (Borrvalho, 2015; Díaz *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014). Uma das soluções desenvolvidas e aplicada, assenta na recuperação de proteínas presentes no soro de uma forma simples. Em Portugal, a produção de requeijão é um processo que, desde há muitos anos, foi introduzido neste ramo industrial. No entanto, o soro também se apresenta como um problema por causa da sua elevada carga orgânica e, tal como o soro, não é passível de ser descartado para o meio ambiente sem tratamento especializado (Díaz *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014). A sua valorização tem interesse pelas suas propriedades nutritivas e funcionais, bem como, pelo seu potencial económico.

A utilização de tecnologias para valorizar o soro de leite, passam por encontrar soluções viáveis, que permitam a extração dos constituintes primordiais para este projeto, proteínas e lactose.

Neste seguimento, a concentração de proteínas de soro passa pela extração de água, lactose e sais minerais através de ultrafiltração (UF), resultando apenas proteínas que posteriormente serão secas. Esta solução é praticada em grande escala pelas indústrias de grande dimensão, uma vez que, a razão entre o volume de subprodutos e o custo da sua concentração apresenta lucros. Esta realidade, para pequenas e médias empresas, pode ser uma visão ainda bastante longínqua, como tal, têm de encaminhar o soro de leite para ETAR's específicas para tratamento prévio antes da descarga para o ambiente, o qual tem de cumprir com determinados parâmetros, (Anexo II) (Costa, 2011). Este processo, apesar de ser um procedimento ecológico, a nível económico nas empresas só se traduz como um custo.

Tendo consciência desta realidade e com o intuito de poder contribuir para melhorias ambientais e económicas, aliado à inovação no sector agroalimentar, desenvolveram-se estas bebidas. Para as quais se recolheu o tomate que não possui características exigidas para comercialização, obteve-se sumo deste e adicionou-se às duas bases que se obtém do tratamento soro de leite. Por outro lado, é importante realçar a sustentabilidade económica das bebidas traduzindo-se em credibilidade para que estas sejam comercializados. O custo de produção será diminuto, por causa do manuseamento de matérias-primas que até agora são consideradas “lixo” ou que não têm a devida valorização. Para além disso, o fabrico destas bebidas é inovador, pois ao contrário do que ocorria até há bem pouco tempo, a tecnologia utilizada neste projeto permite o total aproveitamento do soro de leite, em que só a parte do concentrado de proteínas era aproveitado, descartando a matriz dos açúcares naturais (lactose). Mas esta matriz além das propriedades nutricionais, é, igualmente, poluente. Outro objetivo deste trabalho, assenta numa tecnologia do tipo *Clean*, que é utilizada na produção, possibilitando a otimização do processo de fabrico, reduzindo custos. Mais especificamente, através da reutilização da água, para lavagem e higienização das máquinas ou ainda a sua utilização para rega, desenvolvendo um ciclo fechado de produção.

Em consideração a tudo o que foi mencionado anteriormente, ao conseguir desenvolver estes produtos de valor acrescentado, estaremos não só contribuir para o meio ambiente, como para a saúde humana, mas, sobretudo, a inovar num sector estagnado que pode gerar mais-valias para os empresários do sector e, conseqüentemente, para a economia de Portugal.

Capítulo III- Materiais e Métodos

3.1 Preparação das amostras de tomate

Os tomates utilizados neste estudo foram cedidos pela empresa Zé Veríssimo (Arazede - Montemor-o-Velho). A amostra de tomates foi lavada, seca e posteriormente removeram-se as partes exteriores que estivessem podres, mas não se retirou o seu pedúnculo. De seguida, a amostra com cerca de 10 kg de tomate foi dividida em sacos para que a congelação fosse mais homogénea. A congelação ocorreu numa arca congeladora a uma temperatura de -15°C. Quando da sua utilização, descongelava-se a quantidade de tomates necessária e cortavam-se estes em pequenas dimensões para facilitar o processo de trituração dos mesmos, realizado com o auxílio de uma varinha mágica doméstica.

3.2 Preparação das amostras de soro de leite

O leite foi recebido a 25 de novembro de 2017 pela Oficina Tecnológica de Lacticínios da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) para a produção de queijo. Após o fabrico de queijo, o soro obtido foi sujeito a tratamento, primeiro a desnatagem e de seguida ultrafiltração. A desnatagem foi executada por uma centrífuga industrial (Westfalia Separator, MTA 9.00.104) que separa o soro por diferenças de densidades, reduzindo a gordura presente de 0,6 % para 0,04 %. Esta etapa é crucial, uma vez que permite obter um produto mais saudável e a continuidade do processo, pois, a nata é um constituinte da matéria-prima inicial que devido ao seu elevado tamanho molecular, impede a separação dos produtos (proteínas e lactose) através das membranas da ultrafiltração, obstruindo-as. Após esta etapa, encaminhou-se o soro desnatado para a unidade piloto de ultrafiltração (PROQUIGA) para reter e concentrar as proteínas, utilizando uma membrana de 10 kDa, a uma pressão transmembrana média de 4 bar. O caudal diminuiu ao longo do tempo devido à polarização da membrana de UF, iniciando a 75 L/h e passando a 40 L/h. Nesta etapa iniciou-se com 100 L de soro desnatado procedendo a uma concentração de 10 vezes, ou seja, obtiveram-se 10 L de CLPS. Desta técnica é sobranete o permeado que é constituído maioritariamente por água, lactose e sais minerais.

De seguida, o PUF é sujeito a osmose inversa, técnica que através de bombas de alta pressão, obriga a água a deslocar-se através da membrana, da solução mais concentrada para a solução menos concentrada, retendo sais (Figura nº8). A membrana utilizada é semipermeável, SW30-4040, número 80741, com uma pressão transmembrana de 55 bar com uma taxa de fluxo de 1950 m³/d, o que permite uma concentração de sais e de lactose

em cerca de 95 % a 99 %. Com este processo, obteve-se uma concentração 3 vezes maior de lactose que o produto obtido no final da ultrafiltração, obtendo-se 30 L de PUFC. Antes de se proceder à osmose inversa, foi necessário deixar arrefecer o permeado para que a temperatura não fosse influenciadora do fluxo desta técnica.

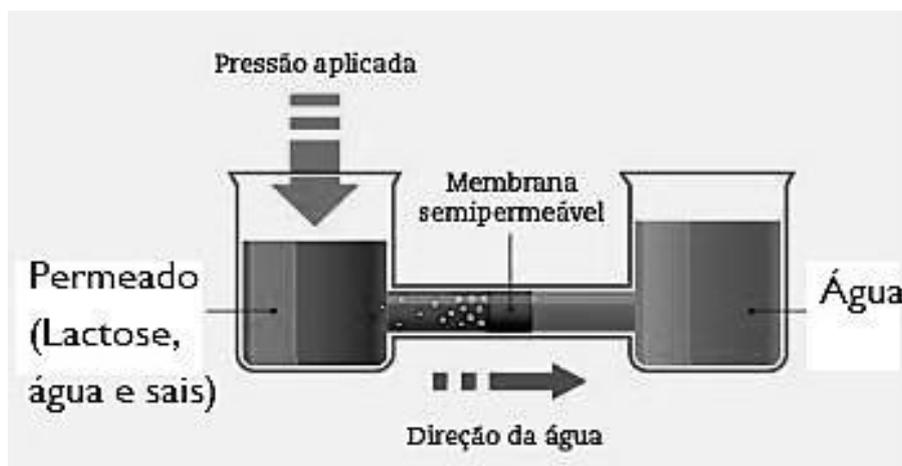


Figura nº8- Esquema da técnica osmose inversa.

De seguida, efetuou-se uma homogeneização do CLPS com o objetivo de retardar ou minimizar uma eventual sedimentação das partículas em suspensão. Para a homogeneização, o concentrado foi forçado a passar num crivo através de orifícios muito finos a uma pressão entre 70 atm a 100 atm e a uma temperatura de 65°C, de modo a fragmentar finamente os sólidos em suspensão. Para tal foi utilizado um homogeneizador Rannie, modelo Blue Top.

Finalizados os processos de tratamento do soro, os dois produtos foram submetidos a pasteurização, e posteriormente, envasilhados e congelados a -18°C. Ainda em relação aos processos aplicados ao soro de leite.

A figura nº9 é representativa do processo para a obtenção do CLPS e do PUFC.

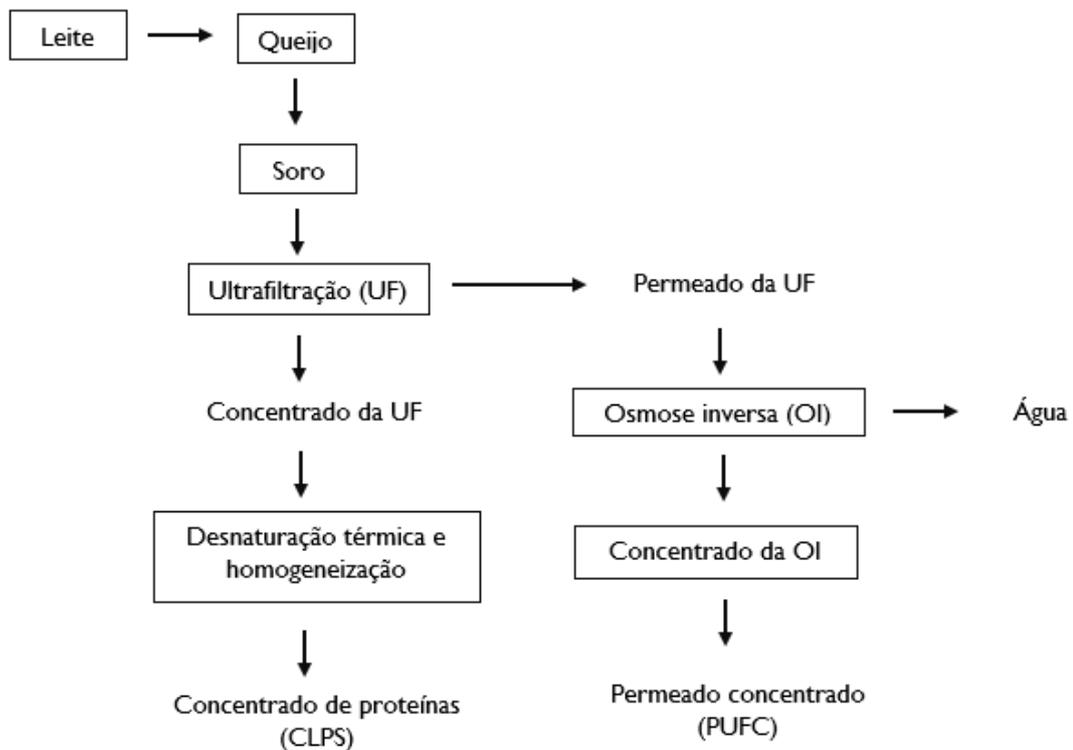


Figura nº9- Diagrama do processo de produção de concentrado líquido de proteínas de soro (CLPS) e permeados de ultrafiltração concentrado por osmose inversa (PUFC).

3.3 Preparação das amostras para o produto final

Para iniciar as formulações do produto final foi necessário descongelar CLPS e o PUFC. Após descongelação, e antes de adicionar o tomate, o CLPS foi sujeito à fermentação numa estufa Memmert a 44°C por um período mínimo de 20 horas. Para a fermentação adicionaram-se os microrganismos *Lactobacillus* sp. e probióticos de mistura CPR I (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus paracasei paracasei*).

O permeado concentrado (PUFC), antes da fermentação, foi sujeito a um aquecimento com auxílio de uma placa de aquecimento e foi-se medindo a sua temperatura até esta atingir 30°C, além da necessidade de apresenta um pH de 6 ou inferior, condições ideais para que a enzima lactase produzida pela levedura *Kluyveromyces lactis* metabolize a lactose, degradando-a em glicose e galactose. Este processo tem de ser controlado durante 30 minutos à temperatura referida, para que no final a presença de lactose esteja de acordo com a legislação, inferior a 0,01 %, para a atribuição da menção “isento de lactose” (Diretiva 2015/2203). É de salientar, que após verificarmos que a quantidade residual de azoto no PUFC, era um fator limitante para o crescimento dos *Lactobacillus* sp. fermentadores, procedeu-se a um pré-

enriquecimento destas bactérias e só então se incubou o produto de glicose e galactose com essas mesmas bactérias.

O objetivo do processo fermentativo é aumentar o período de validade dos produtos devido à redução do pH, que inicialmente era de pH 6 para uma gama de valores entre 4,0 a 4,5.

3.4 Formulações testadas

Para chegar a uma aceitação do produto final de ambas as bebidas desenvolvidas, foram executadas diversas formulações, nas quais as variáveis assentaram na utilização de tomate inteiro congelado e fresco, diferentes tipos de tomate, sumo de tomate, adição de outros hortofrutícolas e sumo de limão, além da presença de edulcorantes naturais e de sal (Anexo III).

Depois das várias experimentações com as diversas variedades de tomate e pós diversas provas sensoriais com vinte voluntários, chegou-se a uma formulação final e unanimemente aceite para ambos os produtos desenvolvidos, tabela nº I I. O sumo de tomate e de cenoura foi extraído individualmente, recorrendo a uma máquina doméstica de sumos da marca Philips. Note-se de que entre cada extração a máquina foi devidamente lavada.

Tabela nº I I - Formulação final de ambos os produtos desenvolvidos.

| Produto Proteico | Produto Energético |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 100 mL de sumo de tomate Rama | 100 mL de sumo de tomate Rama |
| 50 mL de sumo de cenoura | 50 mL de sumo de cenoura |
| 100 mL de CLPS | 100 mL de PUFC |
| 1 % de sal | 1 % de sal |

3.5 Métodos de determinação da composição dos produtos finais

3.5.1 pH

O pH de cada produto (proteico e de valor energético) foi diretamente medido com o potenciómetro (Jenway Metter 3505).

3.5.2 Humidade relativa e sólidos totais

As amostras de ambos os produtos finais foram sujeitas a uma desidratação a 100°C durante 1 hora numa estufa (Memmert Schawabach), adaptado da NP 475 (1983) - resíduos com valores de gordura inferiores a 0,1 % e para produtos húmidos. O cálculo da humidade foi efetuado, de acordo, a partir da equação 1:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{\text{Massa da amostra húmida (g)} - \text{Massa da amostra seca (g)}}{\text{Massa da amostra húmida (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Para o cálculo dos sólidos totais (equação 2), foi feita uma relação mássica direta entre o peso total das amostras antes de serem desidratadas e o peso final das mesmas após a desidratação.

$$\text{Sólidos totais (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato seco (g)}}{\text{Massa da amostra inicial (g)}} \times 100 \quad (2)$$

3.5.3 Cinzas

As amostras foram previamente desidratadas em banho de areia a 100°C durante meia hora. Posteriormente, colocou-se durante 3h na mufla Gallenhamp, durante a primeira meia hora a 370°C e nas restantes a 550°C. Dando o término desta fase, remove-se as amostras da mufla e deixam-se arrefecer no exsicador, quando estiverem à temperatura ambiental, pesam-se. Este procedimento foi adaptado das NP 477 (1983) e NP 872 (1983). O cálculo das cinzas foi conforme a equação 3:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{Massa da amostra em cinza (g)}}{\text{Massa da amostra inicial (g)}} \times 100 \quad (3)$$

3.5.4 Proteínas

Ambas as amostras dos produtos foram previamente sujeitas a uma mineralização. Adiciona-se à amostra (0,5 g) uma pastilha de selénio e 25 mL de H₂SO₄ concentrado, leva-se

a mineralizar durante 3 horas a 420°C. Retira-se do mineralizador e deixa-se arrefecer na hotte até não existirem vapores e adiciona-se 75 mL de água destilada. Coloca-se o tubo de mineralização e um erlenmeyer de 250 mL com 25 mL de H₂SO₄ a 0,2 N e com 2-3 gotas de indicador de vermelho de metilo, deixar destilar o tempo necessário até que se atinja 150 mL (Sistema Kjelttec), adaptado da NP 913 (1982).

Por último, recorreu-se a uma titulação com NaOH 0,2 N até à viragem do indicador para amarelo.

Para o ensaio branco, pesou-se 0,5 g de sacarose e procedeu-se da mesma maneira. De seguida, efetuaram-se os cálculos para a percentagem de proteínas, recorrendo à equação 4 (Globalab,2013).

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{(V1 - V2) \times 0,28 \times 6,38}{\text{massa da amostra}} \quad (4)$$

*sendo o “V1” o volume do titulante NaOH 0,2 N gastos no ensaio em branco; e o “V2” o volume do titulante NaOH 0,2 N utilizado na titulação da amostra.

3.5.5 Gordura

A quantificação da matéria gorda foi efetuada recorrendo-se ao método de Soxhlet, técnica adaptada da NP 1224.

Inicia-se pesando, para uma cápsula de porcelana, 3 g a 5 g de amostra tratada com 5 g de sulfato de sódio anidro, que *a posteriori* é transferida para o cartucho de papel de filtro, juntamente com os vestígios de amostra na cápsula que são limpos utilizando algodão humedecido com éter de petróleo. Por fim, coloca-se o cartucho de papel de filtro, previamente preparado, no aparelho de extração, fazendo uma sifonagem e meia com éter de petróleo. A extração é feita durante 5 horas, contadas após o início de fervura do éter (30°C). Terminada a extração, leva-se ao evaporador rotativo (Büchi RE111 Rotavapor) ao qual está incorporado um banho de água com uma resistência de aquecimento. Posteriormente, encaminham-se as amostras para a estufa (Memmert Schawabach) durante 1 h a 103°C. Após arrefecimento no exsiccador, pesam-se os balões (balança Metter Toledo AG285), considerando que duas pesagens sucessivas não podem diferir entre si mais do que 0,1 g, caso contrário efetua-se mais duas determinações.

$$\text{Gordura (\%)} = \frac{\text{massa do balão após secagem} - \text{massa do balão}}{\text{massa da amostra}} \times 100 \quad (5)$$

3.5.6 Fibra

Para determinar a percentagem de fibra bruta existente nas amostras, utilizou-se o método de Weende adaptado para Fibertec (TRADE RayPa- Fibertest). Pesou-se 1 g de amostra seca e desengordurada para um cadinho filtrante. Colocou-se o cadinho no Fibertec e adicionou-se 100 mL de H₂SO₄ 0,26 N fervente e deixou-se ferver durante 30 min, contados após iniciar a fervura. Desligou-se o aquecimento, filtrou-se e lavou-se o resíduo com água destilada a ferver, três vezes. Adicionou-se, depois, 100 mL de NaOH 0,32 N fervente e deixou-se ferver durante 30 min. De novo, se desligou o aquecimento, filtrou-se e lavou-se o resíduo com água destilada a ferver, três vezes. Os cadinhos foram retirados do Fibertec e colocados em estufa (Memmert Schawabach) durante uma noite a 103°C. De seguida, removeram-se os cadinhos para o exsiccador, deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente, e pesaram-se (P1). Levaram-se os cadinhos à mufla (Gallenhamp) a 550°C durante 1 hora, e colocaram-se no exsiccador, deixaram-se, novamente, arrefecer à temperatura ambiente, e voltam a pesar-se (P2), (Mineiro, 2014).

$$\text{Fibra bruta (\%)} = \frac{(P1-P2)}{\text{massa da amostra}} \times 100 \quad (6)$$

3.5.7 Cloretos solúveis em água

Para a determinação dos cloretos, recorreu-se ao método de Charpentier-Volhard, adaptado da NP 471 (1983).

Pesou-se, para um balão volumétrico de 500 mL, 5 g de amostra e adicionou-se 1 g de carvão ativado, 400 mL de água destilada, 5 mL de solução Carrez I e 5 mL de Carrez II. Levou-se a um agitador mecânico durante 30 min a 400 rpm. De seguida, completou-se o volume com água destilada, homogeneizou-se e filtrou-se.

Do filtrado, mediu-se 25 mL para um balão, ao qual se adicionou mais 25 mL de água destilada, 5 mL de ácido nítrico (1,38 g/mL) e 2 mL de solução saturada de ferro III. Posteriormente, adicionou-se um volume de 20 mL de solução nitrato de prata a 0,1 N e 5 mL de éter dietílico, agita-se fortemente até aglutinação do precipitado.

Titulou-se o excesso de nitrato de prata com uma solução de tiocianato de potássio 0,1 N, até que a cor vermelha-acastanhada fosse persistente. Para o ensaio em branco procedeu-se da mesma maneira e apenas se substituiu a solução da amostra por água destilada.

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{50 \times 5,845 \times (V1 - V2)}{V \times \text{massa da amostra}} \quad (7)$$

V - Volume de solução tomado para a titulação

V1 - Volume gasto de tiocianato de potássio no ensaio em branco

V2 - Volume gasto de tiocianato de potássio para a amostra

3.5.8 Fósforo

Pesaram-se 2 g de amostra para um cadinho. Procedeu-se à sua incineração em mufla a 600 C, durante 4 horas até à obtenção de cinzas. Após o término, as cinzas foram recuperadas em 1 mL de ácido clorídrico (HCl 1 N) e ferveu-se por 5 min. Deixou-se arrefecer e transferiu-se para um balão de 100 mL complementando o seu volume com água destilada. De seguida, filtrou-se e retirou-se 10 mL do filtrado que foi diluído a 100 mL. Pipetou-se 1 mL da alíquota para um tubo de ensaio e adicionou-se 9mL de ácido molíbdico e 0,8 mL de solução de sulfato ferroso. Preparou-se um branco com 1 mL de água destilada e 10 mL de solução padrão de fósforo 20 µg/mL.

O fósforo foi determinado por colorimetria por reação com ácido molíbdico e sulfato ferroso no modo de transmitância, $\lambda=720$ nm, recorrendo a um espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Costa, 2009; Suárez *et al.*, 2007).

$$\text{Fósforo (\%)} = \frac{2 \times (-\log TA)}{m \times (-\log Tp)} \quad (8)$$

m - massa da amostra a partir das cinzas

TA - transmitância da amostra

Tp - transmitância do padrão

3.5.9 Hidratos de carbono

A análise do conteúdo em hidratos carbonos, isto é, maioritariamente lactose que consta nos produtos lácteos, foi executada através de um kit-teste enzimático da Roche para determinar lactose e D-galactose em alimentos (BOEHRINGER MANNHEIM/R- BIOPHARM Enzymatic Bioanalysis/ Food Analysis).

Os restantes hidratos de carbono (HC) foram calculados através da equação 9.

$$\text{HC(\%)} = \text{Sólidos totais} - ((\%) \text{cinzas} + (\%) \text{gordura} + (\%) \text{proteínas}) \quad (9)$$

3.6 Determinação *in vitro* da capacidade antioxidante dos extratos das amostras

Nesta investigação, recorreu-se a diferentes solventes para extração, consoante os compostos bioativos a serem analisados. Além disso, utilizaram-se métodos distintos para avaliar o potencial antioxidante das 3 amostras (fruta - tomate e cenoura; produto proteico com fruta; produto energético com fruta); determinação do sistema de inibição do radical DPPH e do teste de branqueamento do β -caroteno, determinação do conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides. Paralelamente, recorreu-se a HPLC para análise cromatográfica do licopeno em ambas as amostras.

3.6.1. Preparação e extração das amostras

Após a obtenção do sumo de tomate e cenoura, para a qual se recorreu a uma máquina doméstica de sumos (Philips), e da fermentação da base proteica (CLPS) e da base energética (PUFC) do soro de leite, preparou-se as amostras finais, de acordo com a tabela nº12. Mediram-se 5 mL de cada uma destas amostras, às quais foram adicionados 50 mL de etanol absoluto (SIGMA-Aldrich) e sujeitas a uma agitação de 400 rpm durante 30 min à temperatura ambiente (agitador horizontal HS 501D da IKA®-Labortechnik). As amostras foram centrifugadas a 15°C durante 15 min a 5000 g (centrífuga SIGMA modelo 3-16K da SIGMA Laborzentrifugen GmbH). O sobrenadante foi retirado para um balão periforme e sujeito a uma evaporação completa do etanol a 35°C através de um evaporador rotativo RE-111 da BÜCHI Rotavapor e bomba de vácuo V-700 da BÜCHI. Com o auxílio de uma espátula, retirou-se e pesou-se 30 mg (balança analítica AG285 Mettler Toledo) do resíduo seco para um balão de 10 mL, dissolvendo-o num volume final de metanol. Estas soluções foram devidamente envolvidas com papel de alumínio e armazenadas no frigorífico durante 3 dias e foi a partir delas que se realizaram os ensaios para avaliação da capacidade antioxidante (sistema de inibição do radical livre DPPH e teste do branqueamento do β -caroteno), determinação dos compostos fenólicos e flavonoides (Martins, 2018).

Enquanto que, para a determinação do licopeno, a extração foi realizada com 50 mL da mistura hexano (VWR Chemicals): acetona (José Manuel Gomes Dos Santos, LDA): etanol da Merck (2:2:1), volume que se adicionou a 3 mL de cada uma das amostras (Costa, 2009; Nellis *et al.*, 2017). Posteriormente, recorreu-se a uma agitação durante 30 min a 400 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Tabela nº12- Composição das amostras.

| Fruta | Produto Proteico | Produto Energético |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 100 mL de sumo de tomate | 100 mL de sumo de tomate | 100 mL de sumo de tomate |
| 50 mL de sumo de cenoura | 50 mL de sumo de cenoura | 50 mL de sumo de cenoura |
| _____ | 100 mL de CLPS | 100 mL de PUFC |
| _____ | 1 % de sal | 1 % de sal |

3.6.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo sistema de inibição do radical livre DPPH

O seguinte método avalia a atividade antioxidante através da capacidade que os compostos presentes nas amostras têm para capturar radicais DPPH. Este método é avaliado através de uma reação entre o DPPH[•] e um composto antioxidante, e este último cede um eletrão de hidrogénio, promovendo a redução do DPPH[•]. Esta reação é visível, pois é colorimétrica quando a solução violeta escuro dá lugar a uma solução violeta clara, podendo por vezes ficar incolor.

Inicialmente, procedeu-se à preparação, num balão âmbar, de uma solução de DPPH (VWR Chemicals) em metanol (VWR Chemicals) com uma concentração de 14,2 µg/mL. De seguida, em tubos de ensaio fez-se reagir 50 µl de extrato da amostra (soluções previamente preparadas) com 2 mL da solução de DPPH[•] em metanol e colocaram-se os tubos ao abrigo da luz durante 30 min. Como controlo, utilizou-se 50 µl de etanol (Alves, 2009; Martins, 2018; Moure *et al.*, 2001). Este ensaio foi realizado em triplicado para cada amostra.

Após a reação, mediu-se a absorvância no espectrofotómetro U-3900 da Hitachi com *software* U.V Solutions 3.0, a um comprimento de onda de 515 nm para avaliar a redução do radical DPPH que, ao verificar-se, provoca uma descoloração da solução de radical DPPH e, consequentemente, uma diminuição da absorvância face ao controlo. Os ensaios foram realizados em triplicado. A percentagem de inibição (IP %) do radical DPPH foi definida como

a percentagem de redução na absorvância em relação ao valor inicial, através da fórmula (Barimah *et al.*, 2017):

$$IP (\%) = \frac{Ac - AA_{30}}{Ac} \times 100 \quad (10)$$

Em que,

IP (%) - Percentagem de inibição do radical DPPH;

Ac - Absorvância do controlo;

AA 30 - Absorvância da amostra após os 30min.

Após o cálculo da IP (%), procedeu-se à avaliação da capacidade antioxidante através do equivalente Trolox (ET). O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 carboxílico, designado de Trolox é um antioxidante sintético hidrossolúvel, semelhante à vitamina E, usado para fazer comparações entre a capacidade antioxidante de uma dada substância com a capacidade antioxidante do Trolox. Para efetuar esta comparação preparou-se uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de Trolox (Melo *et al.*, 2006).

Curva padrão do Trolox

Foi preparada uma solução *stock* de Trolox 97% (SIGMA-Aldrich) com concentração de 500 µg/mL em metanol, a partir da qual se fizeram várias diluições, as quais apresentaram concentrações entre 3 µg/mL e 100 µg/mL (Figura nº10). De seguida, operou-se de acordo com o método anterior, para as diversas concentrações.

Os ensaios foram realizados em triplicado. Para traçar a curva de calibração com a percentagem de inibição do radical DPPH *versus* concentração (µg/mL) de Trolox utilizou-se a média dos replicados. Os resultados são expressos em mg de equivalentes Trolox (ET) por g de extrato.



Figura nº10- Preparação das diluições com quantidades distintas de Trolox para a construção da curva de padrão.

3.6.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo teste do Branqueamento do β -Caroteno

Este ensaio, assim como o anterior, permite avaliar a capacidade antioxidante. Para a realização deste, seguiu-se a metodologia descrita por Miller (1971). Inicialmente, preparou-se uma solução de β -caroteno (SIGMA-Aldrich) com uma concentração de 0,2 mg/mL, diluindo-se 2 mg de β -caroteno (pesado numa balança analítica AG285 Mettler Toledo) em 10 mL de clorofórmio. Num balão de fundo redondo, fez-se uma emulsão de 200 mg de Tween[®]40 (SIGMA-Aldrich), 20 mg de ácido linoleico (SIGMA-Aldrich) e 1 mL da solução de β -caroteno (Figura nº11). De seguida, com recurso a um evaporador rotativo RE-111 Rotavapor e bomba de vácuo V-700 da BÜCHI, a 40°C e sob pressão reduzida, evaporou-se o clorofórmio (Fisher Scientific.). Ao resíduo resultante, adicionou-se 50 mL de água ultrapura oxigenada (através de agitação durante 30 min em placa de agitação magnética Agimatic 243) e agitou-se vigorosamente até formar uma emulsão estável. Em tubos de ensaio, fizeram-se reagir (em triplicado) 0,2 mL de extrato da amostra com 5 mL da emulsão de β -caroteno. Os tubos foram agitados e colocados num bloco de aquecimento (SHT 1 da Stuart Scientific) a 50°C durante 120 min. Para os ensaios de controlo utilizaram-se 0,2 mL de metanol (VWR Chemicals). A absorvância dos ensaios controlo foi medida no espectrofotómetro U-3900 da Hitachi com *software* U.V Solutions 3.0, a 470 nm, antes e após os 120 min de reação, enquanto a absorvância das amostras foi medida, apenas, no final dos 120 min no mesmo comprimento de onda (Martins, 2018).

O Coeficiente da Atividade Antioxidante, AAC (Antioxidant Activity Coefficient), foi calculado através da seguinte equação (Koleva, 2007; Martins, 2018):

$$AAC = \frac{AA\ 120 - Ac\ 120}{Ac\ 0 - Ac\ 120} \times 1000 \quad (11)$$

Em que,

AA 120 - Absorvância da amostra após 120 min de reação;

Ac 120 - Absorvância dos ensaios de controlo após 120 min de reação;

Ac 0 - Absorvância dos ensaios de controlo no tempo inicial.



Figura nº 11 - Emulsão.

3.6.4 Determinação dos compostos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais, recorreu-se ao método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (SIGMA-Aldrich), dado que é o mais corrente para esta avaliação. É um sistema que tem por base uma mistura de dois ácidos (fosfotungstíco e fosfomolibdico), de coloração amarela em meio básico. A presença de compostos fenólicos nas amostras, ao serem oxidados em meio básico, formam O_2^- que ao reagir com os ácidos desencadeiam uma cor azul com intensa absorvância (Marques, 2017). Outro ponto determinante na sua escolha, assenta no facto de ser um método recomendado para análise destes compostos, numa diversidade de substratos, por se apresentar pouco suscetível a interferências de proteínas (Silva, 2010).

Adicionou-se 7,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, que previamente se preparou uma solução com água ultrapura, 1:10 v/v, a uma alíquota de 1 mL de extrato da amostra e deixou-se a repousar à temperatura ambiente. Após 5 min, foram adicionados 7,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Merck) com uma concentração de 60 mg/mL. Este ensaio foi executado em triplicado. As soluções foram agitadas e guardadas ao abrigo da luz, durante 2 horas. A figura nº12 representa este ensaio colorimétrico, o antes e o depois das 2 horas no escuro. Após este período, mediu-se a absorvância no espectrofotómetro (U-3900 da Hitachi com *software* U.V Solutions 3.0) a 725 nm, usando água como branco. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE, Gallic Acid Equivalents), (Abreu *et al.*, 2012; Barimah *et al.*, 2017; Erkan. *et al.*, 2011; Martins, 2018; Melo *et al.*, 2006).

Curva padrão do ácido gálico

Preparou-se uma solução mãe de ácido gálico (SIGMA-Aldrich) em metanol (VWR Chemicals), com concentração de 10 mg/mL e dessa fez-se uma solução intermédia de 5 mg/ml. A partir desta efetuaram-se oito diluições com uma gama de concentrações entre 0,025 mg/mL a 0,5 mg/mL. Os diferentes padrões foram tratados como descrito anteriormente. A curva de calibração foi construída, absorvância *versus* concentração (mg/mL) de ácido gálico (Anexo V), da qual se obteve a equação $y=7,0205x-0,0057$ ($r^2=0,9889$) (Siddiqui *et al.*, 2017).

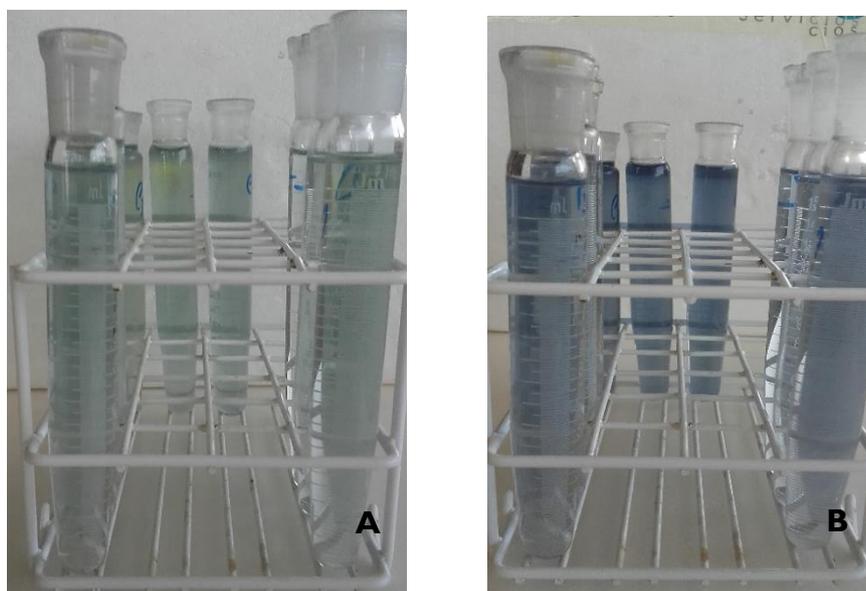


Figura nº12- Determinação do conteúdo em compostos fenólicos das amostras. A) Amostra com reagente Folin-Ciocalteu. B) Amostra após 2 horas no escuro com formação de uma coloração mais intensa, característica da presença de compostos fenólicos.

3.6.5 Determinação dos compostos flavonoides

Os fenólicos são compostos antioxidantes, tornando-os potentes quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação. Os flavonoides abrangem as flavonas, flavonois e taninos condensados, todos metabolitos secundários das plantas, cuja atividade antioxidante está diretamente relacionada com a presença de grupos OH livres. A determinação destes compostos foi executada através de um método espectrofotométrico, baseado na formação de um complexo entre o íon Al^{3+} e um grupo carbonilo, originando soluções de rosa em meio alcalino (Marques, 2017; Nunes, 2012).

O conteúdo de flavonoides totais (TFC) foi determinado através da metodologia utilizada por Martins (2018) e Yoo *et al.* (2008).

Tomou-se uma alíquota de 1 mL de extrato da amostra para um tubo de ensaio e adicionaram-se 4 mL de água ultrapura. De seguida, adicionou-se 0,3 mL de nitrito de sódio (SIGMA-Aldrich), (5%, p/v preparado com água ultrapura) e homogeneizou-se. Após 5 min, juntou-se 0,6 mL de cloreto de alumínio da SIGMA-Aldrich (10 %, p/v preparado com água ultrapura) e homogeneizou-se novamente. Ao fim de 6 minutos, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio fornecido pela Merck (IM, preparado com água ultrapura) e 2,1 mL de água destilada, ensaio realizado em triplicado. A figura nº13 ilustra este ensaio colorimétrico. A solução foi homogeneizada e, de seguida, procedeu-se à leitura da absorvância a 510 nm no espectrofotómetro U-3900 da Hitachi com *software* U.V Solutions 3.0., utilizando água como branco. Os resultados foram expressos em equivalentes de epicatequina por g de extrato (mg de ECE/g de extrato) (Barimah *et al.*, 2017; RE *et al.*, 2002).

Curva padrão da epicatequina

A (-) -epicatequina ($\geq 90\%$) fornecida pela SIGMA-Alfrich, foi utilizada para construir a curva padrão. Inicialmente foi preparada uma solução *stock* de (-) -epicatequina com uma concentração de 1 mg/mL em metanol (VWR Chemicals). A partir desta prepararam-se 7 diluições com concentrações entre 0,025 mg/mL e 0,175 mg/mL. Fez-se o ensaio dos flavonoides totais, como descrito anteriormente, para as várias diluições, determinando-se cinco concentrações que dessem origem a absorvâncias no intervalo obtido para as amostras.

Os ensaios foram realizados em triplicado. Para traçar a curva de calibração com a absorvância *versus* a concentração (mg/mL) utilizou-se a média dos replicados (Anexo VI). No

final, os resultados foram apresentados em mg ECE/g de extrato, utilizando-se a equação da curva de calibração $y=1,3243x+0,0293$ ($r^2=0,9795$).

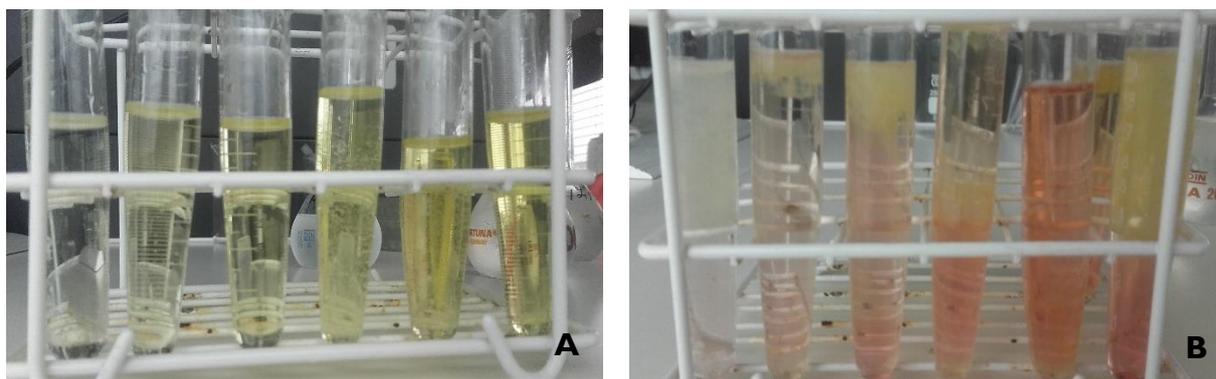


Figura nº13- Determinação do conteúdo em flavonoides totais. A) Preparação das soluções da amostra para análise com NaOH. B) Amostras no final do ensaio.

3.6.6 Determinação do teor em licopeno

Para determinar a concentração de licopeno nas amostras, recorreu-se à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), para a qual se construiu um procedimento adaptado de várias referências bibliográficas (Alves, 2009; Barba *et al.*, 2006; Costa, 2009; Geóirge *et al.*, 2011; Madeira, 2015)

Após o método de extração, anteriormente descrito, adicionou-se 15 mL de água ultrapura e levou-se à placa de agitação magnética Agimatic 243, novamente durante 30 min. De seguida, deixou-se repousar para ocorrer a separação das fases, *a posteriori* removeu-se 1 mL da fase orgânica e secou-se numa corrente de azoto a 40°C. Por fim, dissolveu-se o resíduo seco em fase móvel acetonitrilo da Honeywell: diclorometano da J.Y Baker (75:25). Antes da injeção no sistema cromatográfico Gilson que consiste numa bomba Gilson modelo 321, um detector UV-VIS modelo 155, aliado a uma coluna Hichrom C18 250 × 4.6mm e a um injetor Rheodyne, as amostras foram filtradas com um filtro de 0,45 µm MilliPore, a injeção no sistema ocorreu a um fluxo de 1,5 mL/min, com um *loop* de injeção de 20 µL. A deteção do licopeno ocorreu a um comprimento de onda de 472 nm. A aquisição e tratamento dos dados foi através de computador LG equipado com *software* Gilson UniPoint System que está liagado ao sistema cromatográfico.

Os ensaios foram realizados em triplicado, sendo a média das áreas do pico de licopeno de cada amostra (fruta, produto proteico e produto energético) utilizada para os cálculos.

Preparação do padrão de licopeno

O padrão de licopeno (1 mg da SIGMA Aldrich) foi dissolvido com uma solução de acetonitrilo: diclorometano: metanol (70:20:10) para um balão âmbar de 10 mL até que o houvesse ausência da cor alaranjada tão característica do licopeno. Desta solução mãe, preparou-se uma solução intermédia com uma concentração de 5 µg/mL, a partir desta, executou-se 5 diluições (0,50 µg/mL; 1,00 µg/mL; 1,50 µg/mL; 2,00 µg/mL; 2,50 µg/mL). Após as soluções estarem preparadas, injetou-se no cromatógrafo sob as mesmas condições referidas anteriormente. A curva de calibração do licopeno foi construída, média das áreas obtidas para cada uma das diluições referidas anteriormente vs concentração (µg/mL) de licopeno (Anexo VII).

Capítulo IV- Resultados e Discussão

Os produtos desenvolvidos, produto proteico e energético, contém probióticos e *Lactobacillus* sp. (3.3). Um dos maiores desafios para chegar a estas formulações, assentou no tomate, dado que existem centenas de variedades deste fruto agridoce, sendo umas mais doces que outras. Dos quatro tipos de tomate mais cultivados em Portugal, o tomate de rama é o que se apresenta mais doce comparativamente ao tomate redondo, além de apresentar também elevado desperdício. Deixou-se de parte o tomate chucha, dado que o seu aproveitamento é praticamente completo, ao ser utilizado para caldas e conservas. Relativamente ao tomate *cherry*, apesar de ser o mais doce dos 4 tipos de tomate aqui apresentados, o seu desperdício não é significativo quando comparado com a variedade aqui utilizada (Velo, 2016).

Salienta-se que todas as comparações aqui desenvolvidas para a amostra de fruta (tomate e cenoura) nos diversos ensaios (composição centesimal, determinação do sistema de inibição do radical DPPH, teste do branqueamento do β -caroteno, determinação dos compostos fenólicos, flavonoides e licopeno) foram com dados publicados, referentes ao tomate e ao CLPS e PUFC. Refira-se que os produtos aqui considerados são inovadores, visto não existirem produtos no mercado que culminem na junção do CLPS e do PUFC com tomate e cenoura

4.1 Determinação da composição centesimal dos produtos finais

No caso da composição centesimal, foi efetuado, também, a comparação dos dados obtidos com um produto desenvolvido anteriormente, Toal (Costa e Santos, 2017), assente na junção destas duas partes do soro (CLPS e PUFC) mas com um fruto diferente do aqui estudado, o morango.

Os resultados das análises físico-químicas dos produtos (proteico e energético) com tomate e cenoura, apresentados na tabela nº13 correspondem aos valores de pH, humidade, sólidos totais, cinzas, proteína, gordura, fibra bruta, cloretos solúveis, fósforo, hidratos de carbono totais e lactose.

Tabela nº13- Caracterização físico-química do produto proteico e do produto energético.

| Parâmetros | Amostra do produto proteico | Amostra do produto energético |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| pH | 4,09 ± 0,01 | 4,03 ± 0,01 |
| Humidade (%) | 88,42 ± 0,17 | 93,45 ± 0,48 |
| Sólidos totais (%) | 11,58 ± 0,25 | 6,55 ± 0,90 |
| Cinzas (%) | 0,64 ± 0,03 | 1,00 ± 0,05 |
| Proteína (%) | 7,19 ± 1,44 | 1 ± 0,01 |
| Gordura (%) | 0,30 ± 0,12 | 0,20 ± 0 |
| Fibra (%) | 0,00 ± 0 | 0,00 ± 0 |
| Cloretos solúveis (% NaCl) | 0,35 ± 0,10 | 0,63 ± 0,20 |
| Fósforo (%) | 0,94 ± 0,01 | 0,97 ± 0,01 |
| Hidratos de carbono totais (%) | 3,45 ± 0,09 | 4,35 ± 0,12 |
| Lactose (%) | 0,00 ± 0 | 0,00 ± 0 |
| Valor energético (kcal) | 45,26 | 23,20 |

O valor médio de pH do CLPS e do PUFC obtido após a fermentação de 20 horas, foi de 4,12 e 4,08, respetivamente. Ambos valores esperados, dado que na literatura o intervalo para este parâmetro após este processo são de 4 a 4,5 (Pereira *et al.*, 2014). Após a adição do sumo de tomate, o pH do produto final apresentou-se igual a 4,09 para o CLPS e 4,03 para o PUFC. Sabendo que o tomate é um fruto agridoce, ou seja, apresenta um pH que pode variar entre 4 a 5, verificou-se que a adição do sumo de tomate contribuiu para um pH final de ambos os produtos mais baixo, conforme era previsível (Costa, 2009; Ferreira, 2004).

O teor de cinzas é espectável para ambas as matrizes, CLPS e PUFC, bem como o valor referente a este parâmetro ser superior no PUFC, porque os sais minerais são eliminados através da membrana UF ficando retidos no permeado (PUF) (Borrvalho, 2015). O PUF posteriormente sofre uma concentração (OI), promovendo que os sais minerais fiquem mais concentrados (PUFC).

No que concerne à análise físico-química dos cloretos solúveis, o seu teor é expresso em cloreto de sódio. Os sais minerais do soro de leite, aquando da ultrafiltração, passam para o PUFC, justificando assim a elevada percentagem de cloretos solúveis aquando comparado com o CLPS. Todavia, e como é sabido, o PUFC durante a OI pode apresentar perdas deste sal, dada à sua solubilidade, que pode ser eliminado juntamente com a água.

O produto final não apresenta fibra bruta, pois, qualquer uma das partes do soro de leite (CLPS e PUFC) é isenta de fibra, e só o tomate poderia contribuir para uma percentagem de fibra, uma vez que, tem cerca de 1 % a 2 % de fibra (Almeida, 2006). A fibra encontra-se na casca, na polpa e nas sementes deste fruto, logo como só se utiliza o sumo, a fibra fica retida no resíduo (casca, polpa, sementes).

A concentração dos minerais, potássio, sódio, zinco e fósforo, sofre um incremento ao longo do processo de maturação do tomate, independentemente da variedade do mesmo. O fósforo no fruto depende da variedade e pode oscilar entre 0,007 % a 0,012 % (Costa, 2009). De acordo com a morfologia do tomate, o fósforo, tal como outros minerais, situa-se na polpa. O facto de se ter submetido o tomate a um processo mecânico para extrair apenas o seu sumo, é evidente que parte deste mineral tenha ficado retido no resíduo. Sabendo que o leite é uma matriz rica em fósforo, também o soro de leite apresentará na sua composição fósforo, embora, em quantidades bem maiores (0,9 %), de acordo com Mantovani (2015). Consoante publicações, o valor relativo ao fósforo, tanto no produto proteico (0,94 %) como no energético (0,97 %) é mais próximo da realidade percentual do soro do que da do fruto.

O resultado referente à gordura era expectável para ambos os produtos: 0,30% para o proteico e 0,20 % para o energético. O soro de leite foi desnatado, passando de 0,6 % para 0,04 % de gordura. Analisando a percentagem deste parâmetro no CLPS, de acordo com a bibliografia, este apresenta uma variação entre 1 % a 5 % (Pereira *et al.*, 2014), logo o valor de gordura do nosso produto apresenta-se inferior. Contudo, apresenta-se ligeiramente superior, quando comparado com o valor apresentado na investigação de Borralho (2015). Todos estes valores se apresentam superiores ao valor após a desnatação, dado que com a UF, a gordura ainda presente, fica concentrada. Por outro lado, para o PUFC o intervalo referido é de 0 % a 1 % (Pereira *et al.*, 2014), no qual o valor do produto final onde esta matriz foi utilizada, se encaixa (0,20 %). Também este valor é superior ao mencionado para a percentagem de gordura no soro de leite após a desnatação, uma vez que o PUF obtido do processo de ultrafiltração é sujeito a uma OI para concentrar a lactose e os minerais e remover grande parte da água, originando o PUFC. Este resultado era previsível, já que é sabido que o tomate não iria contribuir significativamente para este parâmetro, dado que é um fruto com baixo teor em gordura (0,2 %) (Almeida, 2006). Aliás, consoante a variedade, esta percentagem é flexível, mas tem um valor máximo de 1% (Costa, 2009). Porém, quando se fala do repiso deste fruto, ou seja, o sobranço deste (casca, semente e celulose), o valor aumenta para 5 % (Roca, 2009). Por isso, a probabilidade do soro de leite em contribuir para o teor de gordura no produto final era esperada. Comparando com os produtos da Toal (proteico e energético)

de morango, a percentagem de gordura (0,3 % para ambos) apresenta-se semelhante aos valores apresentados na tabela nº 12 para ambos os produtos desenvolvidos neste projeto.

O soro de leite, como exposto (3.2), sofre um processo de UF que, não só permite separar o CLPS e o PUF, mas também concentrar a proteína e diminuir a percentagem em água, que pode passar de 94 % em soro inteiro para 85 % em CLPS (Borrvalho, 2015). É de ressaltar que mesmo após a OI, o PUFC irá apresentar uma maior percentagem de água quando comparado com CLPS. Sabendo que o tomate apresenta uma composição elevada em água (90 % a 95 %), o seu sumo será rico em água, levando a que os produtos desenvolvidos apresentem uma percentagem de humidade na ordem de grandeza 88,42 % (produto proteico) e 93,45 % (produto energético). O valor percentual para o CLPS do produto desenvolvido demonstra-se ligeiramente superior quando comparado com dados expostos na literatura (Almeida, 2006; Costa, 2009; Slavov, 2017). Comparativamente aos produtos com morango da Toal, os valores de humidade aqui determinados apresentam-se superiores, porque nos produtos Toal usa-se o fruto inteiro, acabando por apresentar uma firmeza na sua consistência diferente à do sumo, mesmo sabendo que o morango é composto por 90 %-95 % de água (Françoso *et al.*, 2008).

A humidade e os sólidos totais podem ser analisados em conjunto, uma vez que estão inversamente relacionados. A percentagem de sólidos totais da amostra do produto final proteico foi de 11,58 %, valor inferior ao intervalo apresentando para a matriz utilizada (CLPS), 15 % a 20 % (Pereira *et al.*, 2014). Tendo em conta o produto energético, o valor para os sólidos totais foi de 6,55 %, percentagem inferior ao intervalo atribuído ao PUFC, 10 % a 15 % (Pereira *et al.*, 2014). Mas, em ambos os casos, valores superiores aos sólidos totais provenientes do tomate, que se revela nos 6 % (Roca, 2009).

A análise físico-química do conteúdo em hidratos de carbono, no leite, e posteriormente no soro de leite inteiro, revela-se maioritariamente como lactose: para o leite de vaca, uma percentagem de 4,7 %; para o soro um valor de 4,2 % (Azevedo, 2015). Devido ao processo laboratorial utilizado, ultrafiltração, a membrana a que se recorre apresenta um poro com uma dimensão superior à dimensão molecular da lactose, permitindo, assim, que esta passe para o permeado (PUF) e mantenha a concentração original da alimentação no CLPS (Pereira *et al.*, 2014). O CLPS sofre uma fermentação láctica por 20 horas por organismos fermentadores (*Lactobacillus* sp e probióticos de mistura CPR1 (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus paracasei paracasei*)) que consomem hidratos de carbono. Assim, conforme o descrito, os hidratos de carbono, essencialmente a lactose, encontram-se no permeado com percentagens

entre os 4,2 % e 4,8 %. Contudo, como este permeado é sujeito a uma osmose inversa, a lactose vai-se concentrar, sabendo que o fator de concentração utilizado foi de 3 vezes mais, as percentagens relativamente a este hidrato de carbono rondam os 12,6 % e os 14,4 %. O PUFC também foi fermentado sob as mesmas condições do CLPS, permitindo que a lactose fosse consumida. Porém, como o PUFC apresenta uma maior percentagem deste hidrato, procedeu-se à degradação, obtendo glicose e galactose. A degradação foi auxiliada pela enzima lactase do microrganismo *Kluyveromyces lactis*, para que o produto pudesse ser consumido pelos regimes alimentares mais exigentes, intolerantes à lactose. Ao abrigo da legislação da rotulagem (Decreto-Lei n.º 62/2017), os produtos alimentares dirigidos para esta dieta específica, têm de apresentar uma percentagem inferior ou igual a 0,001 %, para serem considerados isentos de lactose ou poderem apresentar uma proporção igual a 1 % para apresentarem a denominação de “baixo teor em lactose”.

Relativamente aos hidratos de carbono nos produtos finais, são maioritariamente açúcares provenientes do sumo de tomate, dado que o fruto é composto por açúcares e rondam os 6 % destes compostos (Costa, 2009; Nakamura *et al.*, 2017). Como no final o que se tem é sumo de tomate, é previsível que existam perdas destes compostos. Como tal, o valor nos produtos finais varia de 3,45 % a 4,35 %, proteico e energético, respetivamente. Ambos se encontram normalizados, sendo que a percentagem do produto energético é superior, consequência da presença da glicose e da galactose. Comparativamente ao produto com morango, ambos os valores aqui estudados são inferiores. Isto ocorre porque o morango por si só tem uma percentagem de 8 % de açúcares e, também, porque nos produtos Toal usou-se a polpa, adicionando sacarose por questões meramente sensoriais (DGS, 2018).

Em conformidade com Pereira (2014), o CLPS apresenta um intervalo entre 6 % a 10 % para a composição proteica, dado este também corroborado pelo estudo realizado por Borralho (2015). O valor calculado para a composição em proteínas do produto aqui analisado foi de 7,19 %, indo ao encontro das informações disponibilizadas anteriormente. Este valor, comparado com a percentagem de proteína do produto com morango, é inferior (9 %), podendo ter ocorrido uma menor taxa de concentração da proteína durante o processo de UF, o que pode ter influenciado um valor mais baixo. Todavia, o valor obtido é validado por estudos realizados por Borralho (2015), Pereira (2014) e Tavares (2012).

Em relação ao PUFC, este é caracterizado com um intervalo de 0,5 % a 4 % de proteína, intervalo que inclui a ordem de grandeza obtida para a percentagem de proteína no nosso produto energético final, 1 % (Pereira *et al.*, 2014).

Apesar de se saber que o tomate apresenta proteína na sua composição (1 % a 2 %), este valor é diminuto quando comparado com a contribuição proteica do soro (Costa, 2009; Nakamura *et al.*, 2017). Concluindo, a proteína apresentada nos produtos finais é maioritariamente proteína animal e não vegetal.

A denominação das duas bebidas, como produto proteico e produto energético, assenta na sua composição nutricional. Assim, a denominação de produto proteico assenta na elevada percentagem de proteína para um produto desta origem. O produto energético, é assim classificado dado a presença, essencialmente, de açúcares naturais (glicose e galactose), como já descrito (1.7.1), que são unidades básicas de energia para o organismo. Calculou-se o valor energético (kj e kcal) para ambos, sabendo que para este parâmetro só entra os valores relativos à proteína, gordura e hidratos de carbono e cada um deles contribui com valores estipulados de 4 kcal, 9 kcal e 4 kcal, respetivamente. Assim, o produto proteico apresentou um valor energético de 45,26 kcal (190,19 kj) e para o produto energético, os valores foram de 23,20 kcal (97,44 kj).

4.2 Sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do β -Caroteno

Os resultados obtidos da determinação de inibição do radical DPPH e do teste do branqueamento do β -caroteno são apresentados na tabela nº14. Os valores são apresentados em mg de ET/g e percentagem de inibição (IP %) (Anexo IV), de modo a facilitar comparações com a literatura. Sabe-se que quanto maior for a absorvância obtida menor será a % de DPPH' (Abreu *et al.*, 2012; Marques, 2017; Nunes, 2012; Shimamura *et al.*, 2014).

Tabela nº14- Teste de inibição do radical DPPH com resultados expressos em mg equivalentes de Trolox por g de extrato (mg ET/g extrato) e % de inibição. Teste do branqueamento do β -caroteno com resultados expressos pelo coeficiente de atividade antioxidante (AAC). Todos os resultados apresentam média \pm DP, n=3.

| Extratos das Amostras | DPPH' | | Branqueamento do β -Caroteno (AAC) |
|--------------------------|-----------------------|-----------------|--|
| | mg de ET/g de extrato | % de inibição | |
| Fruta (tomate e cenoura) | 0,0018 \pm 0,0007 | 5,64 \pm 0,67 | 43,80 \pm 5,37 |
| Produto Proteico | 0,0009 \pm 0,0001 | 5,58 \pm 0,50 | 28,10 \pm 4,70 |
| Produto Energético | 0,0008 \pm 0,0001 | 5,45 \pm 1,61 | 15,65 \pm 2,71 |

Fazendo uma análise geral dos resultados obtidos, verifica-se que tanto para o ensaio de inibição de DPPH', como para o teste de branqueamento do β -caroteno, o extrato de tomate com cenoura manifesta valores superiores (5,64 % e 43,80 AAC).

No ensaio de inibição do DPPH', a % de inibição para todos os extratos é reduzida, comparativamente aos dados da literatura, o que nos permite afirmar que a presença de DPPH' é também baixa. Considerando a diversidade de metodologias aplicadas pelos vários autores para o ensaio de inibição do radical DPPH', desde a concentração da própria solução de DPPH', à quantidade adicionada da solução de DPPH', quantidade de amostra, período de incubação, as diversas fórmulas existentes para o cálculo do Trolox e, ainda, as unidades em que se apresenta a atividade antioxidante, tudo isto, desencadeia uma elevada diversidade, o que torna difícil qualquer comparação.

Por exemplo, a solução de DPPH' pode apresentar diferentes concentrações como, 5×10^{-5} M; 0,2 mM; 0,2 mg/mL e a que foi utilizada neste estudo detêm um valor de 14,2 μ g/mL (Abreu *et al.*, 2012; Erkan, *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012).

Na bibliografia encontram-se estudos que expressam a sua atividade antioxidante em mg de ácido ascórbico/100 g, mmol de molonaldeído/g (Pieniz *et al.*, 2009), % atividade antioxidante (Monteiro *et al.*, 2008), % de inibição (Melo *et al.*, 2006) mg/100 g VCEAC (atividade antioxidante equivalente em vitamina C) (Kuskoski *et al.*, 2005), mg/100 g TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) e μ mol TEAC/g de peso fresco (Toor *et al.*, 2005), μ M Trolox/g de polpa de tomate (Pérez-Jiménez *et al.*, 2006; Sucupira *et al.*, 2012). Outra variável enfatizada, foi a utilização de métodos distintos para avaliar a atividade antioxidante, como o método ABTS (ácido 2,2 - azino - bis(3-etilbenzoti-azolin) - 6-sulfônico),

método ORAC (capacidade de absorção de radicais livres de oxigénio) e o método FRAP (poder redutor do ferro), (Erkan *et al.*, 2008; Sucupira *et al.*, 2012).

Relativamente ao ensaio do β -Caroteno, podemos afirmar que na generalidade, os valores obtidos apresentam-se elevados quando comparados com os valores para o ensaio do DPPH, sugerindo, uma influência positiva pela presença da cenoura (*Daucus carota* L.). A cenoura é um hortofrutícola que pertence ao grupo das raízes tuberosas da família *Apiaceae*, e do ponto de vista nutricional é composta por macronutrientes e micronutrientes, entre os quais o β -caroteno, um dos carotenoides que é responsável pela sua tão característica cor alaranja. Thürmann (2002), no seu trabalho apresentou uma análise ao β -caroteno, numa bebida que continha 80 % de sumo de frutas e 20 % de sumo de cenoura, tendo como resultado uma contribuição de 11 % deste carotenoide. Saliento que a percentagem de sumo de cenoura, anteriormente referida, é igual à utilizada neste trabalho.

De acordo com outros autores, os valores para o β -caroteno são expressos em mg/100g de peso fresco ou em mg/100 g de peso seco (Barba *et al.*, 2006; Caris-Veyrat *et al.*, 2004).

Além das numerosas metodologias disponíveis para a determinação da atividade antioxidante (AAT), a estas estão inerentes interferências, bem como, dentro da mesma metodologia, pode ocorrer discrepâncias por utilização de valores distintos para a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), quantidade de extrato ou solvente.

É de salientar que o tomate é um fruto cuja composição é maioritariamente licopeno (80 % -90 %). Como tal, sendo ele um carotenoide com elevado poder antioxidante, a AAT do tomate corresponde à presença deste caroteno.

4.3 Determinação do conteúdo em compostos fenólicos e em flavonoides

Para a determinação dos compostos fenólicos e flavonoides recorreu-se aos métodos (3.6.6 e 3.6.7) para as 3 amostras: fruta (tomate e cenoura), produto proteico com fruta e produto energético com fruta.

Os resultados obtidos para o extrato de fruta, assim como para as amostras do produto proteico e energético, todos eles preparados em laboratório, apresentam-se na tabela nº15.

Tabela nº15- Conteúdo em compostos fenólicos com resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato) e conteúdo em flavonoides expresso em mg de equivalente de epicatequina por g de extrato (mg ECE/g extrato). Os resultados correspondem a média \pm DP, n=3.

| Extrato das Amostras | Conteúdo em compostos fenólicos (mg GAE/g extrato) | Conteúdo em compostos flavonoides (mg ECE/g extrato) |
|-----------------------------|---|---|
| Fruta | 1,68 \pm 0,08 | 0,08 \pm 0,03 |
| Produto Proteico | 0,89 \pm 0,07 | 0,07 \pm 0,03 |
| Produto Energético | 0,74 \pm 0,02 | 0,04 \pm 0,03 |

Analisando os resultados, verifica-se que o extrato correspondente à fruta (tomate e cenoura) revela um maior conteúdo tanto em compostos fenólicos como flavonoides, algo já expectável, uma vez que, os produtos, proteico com fruta e energético com fruta, sofreram uma adição de uma matriz líquida, promovendo uma diluição destes compostos. Comparando os valores da tabela nº15 verifica-se que para os compostos fenólicos as diferenças são significativas ($> 0,05$), não sendo visível esta situação nos flavonoides.

Na literatura sucedem-se imensos estudos que têm por base o tomate (*in natura* ou processado), para o qual foram determinados os parâmetros mencionados. Em relação aos compostos fenólicos, os valores analisados apresentam variações consoante a metodologia utilizada para avaliar os parâmetros, bem como as unidades em que os resultados são expressos, o solvente de extração e ainda a própria amostra. A maioria dos estudos aqui reportados utilizou para a extração solventes orgânicos, sendo que o metanol foi o predileto da maioria, deixando o etanol e acetona, entre outros, de lado.

Como exemplo, Melo *et al.* (2006) usaram o metanol com solvente extrator para além de dois intervalos de amostra, 0,03 g a 0,4 g de amostra /0,1 mL e 0,06 g a 0,8 g de amostra /0,1 mL, obtendo valores para o teor em compostos fenólicos, 60,88 μ g /0,1 mL e 121,76 μ g /0,1 mL, respetivamente, a cada intervalo de amostra. Por outro lado, Abreu *et al.* (2012) avaliaram a polpa de tomate *in natura* e quando sujeita a processo térmico por dois tempos diferentes (15 min e 90 min). Verificaram, assim, que o valor máximo para a presença destes compostos ocorria aos 90 min, passando de 20 mg/100 g de polpa para 50 mg/100 g de polpa, comprovando que o tratamento térmico favorecia a libertação destes compostos da matriz celular. Monteiro *et al.* (2008), analisaram a presença destes compostos em polpa de tomate industrializada e em tomate inteiro, sendo os resultados 3,562 μ g/mL de ácido gálico e 4,018 μ g/mL de ácido gálico, respetivamente. George *et al.* (2004) referem que a pele do tomate apresenta uma composição em fenólicos de 10,4 mg/100 g a 40 mg/100 g de peso

fresco, enquanto a sua polpa, para o mesmo parâmetro, apresenta valores inferiores, 9,20 mg/100 g a 27 mg/100 g de peso fresco. Similarmente, Lucera *et al.* (2018) efetuaram análises à pele do tomate apresentando o valor de 4 mg de GAE/ g de amostra seca.

Também as condições agrícolas em que a amostra cresceu podem influenciar a composição. De acordo com Caris-Veyrat *et al.* (2004), que tinham como amostra de estudo tomates orgânicos e convencionais, os tomates de origem orgânica apresentaram uma maior concentração em compostos fenólicos do que os convencionais. Consequentemente, as diferentes variedades deste fruto também são uma variável a ter em conta no teor de compostos fenólicos em tomate. Vizzotto *et al.* (2012) demonstraram que esta variedade pode refletir-se na composição em fenólicos num intervalo de 65,01 mg a 223,15 mg de equivalente de ácido clorogénico/100 g de amostra seca. Por último, um estudo que apresenta a composição em fenólicos para as diferentes partes constituintes do tomate (pele, polpa e sementes) *in natura* e liofilizado verificou que no tomate ao natural, os valores foram 12,7 mg GAE/100 g na polpa, 22,0 mg GAE/100 g nas sementes e 29,1 mg GAE/100 g na pele, enquanto no tomate liofilizado os valores finais foram inferiores, mas a variação entre eles foi igual, maior composição na pele e menor na polpa, (Toor *et al.*,2005).

Nenhum destes estudos possibilita uma comparação direta com os extratos aqui utilizados devido à complexa composição que pode desencadear interações sinérgicas ou antagónicas entre os vários compostos (Melo *et al.*, 2006). Isto é, as desigualdades existentes podem dever-se não só aos métodos de extração, como às modificações nas metodologias utilizadas, mas sobretudo à diferente variedade de tomate utilizada, bem como à adição de outro hortofrutícola (cenoura) e de bases de origem láctea (soro de leite).

No estudo de Toor *et al.* (2005), o padrão a que se recorreu foi rotina, expressando-se os resultados em mg de equivalentes de rutina/100 g. Como ocorrido para os fenólicos, a pele do fruto apresenta uma maior concentração de flavonoides, 20,4 mg de rutina/100 g, quando comparada com a polpa do mesmo, 8,2 mg de rutina /100 g.

Savi *et al.* (2007) investigaram a composição ao nível destes compostos em tomate convencional e orgânico, demonstrando que o convencional apresentava uma diferença por excesso de 0,04, ou seja, a sua composição era de 3,3 mg/100 g. Ainda neste estudo, foi abordada a influência de um tratamento térmico para aumento destas substâncias químicas. Verificou-se que após um tratamento térmico, a composição continuava a ser superior no tomate convencional, quando comparada com o orgânico, 5,06 mg/100 g. Um estudo mais recente, Lucera *et al.* (2018), apresentou uma composição na pele de tomate de 2,21 mg de quercetina/ g de amostra seca.

O número de trabalhos científicos que avalia este critério como um parâmetro refletor da atividade antioxidante é muito escasso, quando comparado com compostos fenólicos. Também não foi possível realizar nenhuma comparação direta, porque estes apresentam unidades finais dos resultados diferentes das que foram utilizadas neste projeto.

Concluindo, em relação aos resultados obtidos neste estudo, pode-se verificar que os valores para os compostos flavonoides são bem inferiores aos compostos fenólicos sobretudo, quando comparamos os produtos proteico e energético.

4.4 Determinação do teor em licopeno

Para a execução da análise ao licopeno, através da técnica HPLC, utilizaram-se 5 concentrações, entre 0,5 µg/mL a 2,5 µg/mL, do padrão licopeno (Anexo VII). Esta análise foi realizada à fruta (tomate e cenoura) produto proteico, produto energético, ao CLPS e PUFC fermentados e não fermentados. Dado a discrepância de valores, entre as amostras, analisou-se as bases lácteas, concluindo que estas não contribuem para a concentração final de licopeno calculado nas amostras.

Na figura nº14, encontram-se representados os cromatogramas obtidos, respetivamente, para amostras de fruta (A), produto proteico (B) e produto energético (C), no que se refere à determinação do licopeno.

O teor médio (calculado através da média das áreas obtidas) para a fruta (tomate e cenoura), produto proteico e produto energético foi de 0,033 mg/100 g, 0,110 mg/100 g e de 0,057 mg/100 g, respetivamente. Através destes dados é visível um acréscimo de licopeno no produto proteico comparativamente aos outros dois. Consequentemente, procedeu-se à análise do licopeno no soro e no soro fermentado (Anexo VIII), apesar de já se saber que estes não teriam a presença deste antioxidante, concluindo-se através da HPLC que o licopeno não faria parte da sua constituição. Descartou-se, assim, a hipótese de que poderia ser a base láctea responsável pelo incremento deste carotenoide no produto final.

Como já disse, os carotenoides podem formar complexos com as proteínas, uma vez que, este composto bioativo apresenta uma afinidade elevada para a superfície hidrofóbica das proteínas. Nunes (2012), no seu estudo apresentou análise aos carotenoides, compostos fenólicos e flavonoides num produto com “leite fermentado + fruta”, para o qual ao fim de 14 dias verificou uma maior concentração de carotenoides, comparativamente ao dia zero. Estes valores correspondem à maior complexação com as proteínas presentes na matriz alimentar conduzindo para uma biodisponibilidade elevada, que consoante as condições do meio (pH, temperatura, teor existente de proteína ou de compostos antioxidantes) pode variar.

Os valores respeitantes ao licopeno para sumo de tomate, de acordo com Hallmann (2013) num estudo realizado com sumo deste fruto em 2008 foi de 14,80 mg/100 g, embora em 2009 fosse de 13,15 mg/100 g de licopeno. Viuda-Martos (2016) apresentou teores de licopeno no sumo de tomate de 7,13 mg/100 g, enquanto noutros estudos são apresentados valores que variam entre 7,83 mg/100 g e 10,76 mg/100 g (Perveen *et al.*, 2015). Os dados obtidos neste último estudo foram mais elevados, dado que em todos eles, o fruto (tomate) foi todo triturado, fazendo parte da sua constituição: pele, polpa e sementes. No nosso estudo, o sumo de tomate não foi obtido por trituração, mas por um processo mecânico que permitiu a separação das sementes e da pele. Acresce a condicionante de que ao sumo de tomate foi adicionado, ainda, sumo de cenoura e uma base láctea, não se tratando assim, de um produto final 100 % de sumo de tomate. Este facto promove um fator de diluição do licopeno no final levando a que os valores analisados por HPLC nos produtos aqui desenvolvidos se apresentem inferiores aos descritos por outros que só utilizaram sumo de tomate. Outra condicionante neste trabalho, passa pela ausência de um processo térmico que nos outros estudos faziam incidir no fruto, obtendo melhores resultados, uma vez que, com a temperatura utilizada sobre o tomate, as membranas dos cloroplastos quebravam-se e este carotenoide migrava para a matriz alimentar. Além do estado de maturação do fruto, fator que muitos autores descrevem como o maior influenciador da presença de licopeno no produto alimentar. O tomate utilizado neste trabalho não se apresentava muito maduro, dada à rigidez que ainda lhe é característica (Costa,2009; Marques, 2015).

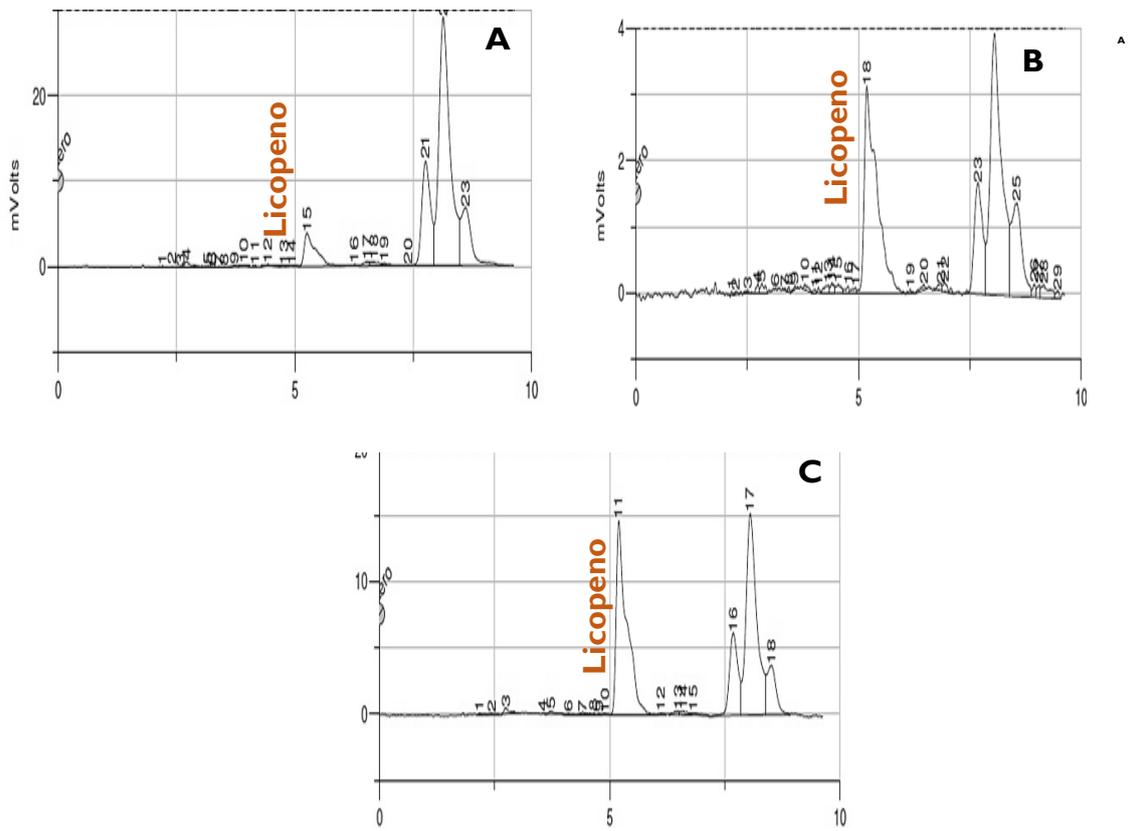


Figura nº14- Cromatogramas resultantes da análise do licopeno na fruta (A), produto proteico (B) e produto energético (C).

Capítulo V- Conclusão

A realização da presente dissertação centrou-se no desenvolvimento de dois novos alimentos com soro de leite e tomate. Esta escolha foi baseada, em parte, pelo elevado desperdício alimentar que resulta da produção de ambos. A esta motivação, aliaram-se também as características nutricionais que apresentam individualmente, e da sua combinação, relevante para a saúde: carga antioxidante, probiótica (mistura CPR I (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus paracasei paracasei*)), proteica e energética avaliadas neste projeto.

O desenvolvimento destes produtos pretende também, além do mencionado, satisfazer necessidades do mercado e da indústria alimentar, criando uma solução para rentabilizar ao máximo as suas matérias-primas, aliando esta produção a conceitos como a sustentabilidade ambiental.

Otimizou-se a formulação para ambos os produtos, com base em provas sensoriais realizadas a voluntários, nas quais foram avaliados os seguintes parâmetros: cor, textura, cheiro e sabor. Através destes testes, conseguiu-se perceber que a cultura gastronómica portuguesa colocava entraves e não apreciava os produtos apenas com tomate. Assim, adicionou-se um legume, a cenoura, para contrabalançar o sabor agri-doce do tomate, tendo resultados bem mais satisfatórios nas provas sensoriais.

Os ensaios permitiram concluir que a combinação destas matérias-primas apresentava características nutricionais vantajosas para o consumo do ser humano, além da boa aceitação que teria junto dos consumidores.

Os resultados obtidos para a caracterização nutricional dos produtos assentam na isenção de lactose e no baixo teor em gordura. Para o produto proteico a percentagem em proteína (7,19 %) é bastante atrativa para a atual procura, que se faz sentir, no mercado alimentar.

A fruta (sumo de tomate e cenoura) foi das 3 amostras a que continha teores superiores para compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante. Enquanto que para os produtos desenvolvidos os teores foram inferiores, dado ao fator diluição que ocorre com a adição de 100 mL de cada matriz (CLPS e PUFC) a uma quantidade total de 150 mL de sumo (100 mL de sumo de tomate e 50 mL de sumo de cenoura).

O produto proteico, para a avaliação do teor de licopeno, apresenta valores superiores comparativamente às outras amostras (3,3 µg/mL).

Todavia, no decorrer deste estudo surgiram algumas questões pertinentes, merecedoras de futuros estudos, visando enriquecer os produtos e esclarecer algumas dúvidas:

1) (embora esta ordem seja perfeitamente arbitrária e indo de encontro ao pretendido inicialmente para este projeto) desenvolver os produtos com tomate congelado sem que a sua descongelação influenciasse negativamente os produtos finais quanto às suas características nutricionais e sensoriais, uma vez que se verificou que o processo de descongelação do tomate utilizado não se revelou eficaz (e por isso se recorreu ao tomate fresco para realizar este trabalho no período de tempo disponível);

2) avaliar a influência da utilização de um processo térmico e do estado de maturação do tomate, nos parâmetros (composição centesimal, capacidade antioxidante, determinação dos compostos fenólicos, flavonoides e licopeno) aqui avaliados para os produtos finais, com o objetivo final de verificar se há diferenças significativas nos valores, e se esses são inferiores ou superiores aos obtidos;

3) desenvolver estudos para esclarecer a interação que ocorre entre os compostos bioativos (sobretudo licopeno) e as proteínas lácteas, existentes na matriz alimentar, otimizando as ações sinérgicas para delinear um perfil antioxidante. Para isso, será necessário realizar essa análise ao longo do tempo, para comprovar que uma possível complexação se mantém, ou não, bem como, efetuar a análise consoante variações no meio (pH, temperatura e teor em proteína). Esta pesquisa, de âmbito nutricional, é essencial para que seja possível fornecer informações mais assertivas sobre o perfil antioxidante destes produtos alimentares com uma possível valorização e disponibilização no mercado alimentar;

4) atendendo ao que referiu relativamente ao tomate, há propriedades biológicas que carecem de ser estudadas, com ensaios *in vivo*, tais como a influência do licopeno num estado pré-obesidade, colesterol e diabetes *mellitus* tipo II. Através destes estudos seria possível avaliar uma eventual dose recomendada, para que haja uma resposta do alimento no organismo humano, tendo em conta as devidas extrapolações animal - ser humano;

5) também em relação ao soro de leite, seria de interesse, sobretudo industrial, acoplar ao processo de ultrafiltração um sistema de degradação enzimática da lactose, cujas enzimas se encontrassem imobilizadas, tornando a produção dos produtos mais ecossustentável e com potencial de comercialização bem mais atrativo.

Em jeito de conclusão final, verifica-se que o trabalho desenvolvido foi de extrema importância, não só pelos resultados obtidos como pelas questões levantadas, mas sobretudo porque se demonstrou que os subprodutos estudados podem deixar de ser apenas tratados como “lixo” ganhando estatuto como potencial para o desenvolvimento de novos produtos com características benéficas para a saúde, economicamente e ambientalmente sustentáveis, dando resposta aos anseios dos consumidores do século XXI.

Capítulo VI- Referências Bibliográficas

ABREU, Manuela. (2017) - **Súmula das recomendações alimentares e nutricionais de instituições de referência sobre uma das patologias mais prevalentes na atualidade – Doença Cardiovascular**. Revisão temática em Ciências da Nutrição. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. [consulta a 1 de fevereiro de 2018]. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/106862/2/207884.pdf>

ABREU, Wilson; BARCELOS, Maria. (2012) - **Antioxidant Activity of the Tomato Pulp Submitted to Domestic Thermal Processing at Different Times**. UNOPAR Científica. Ciências Biológicas da Saúde. 14(2), 71-76.

AHERNE, S. A.; JIWAN, M. A.; DALY, T.; O'BRIEN, N. M. (2009) - **Geographical Location has Greater Impact on Carotenoid Content and Bioaccessibility from Tomatoes than Variety**. *Plants Foods for Human Nutrition*. 64(4), 250-256.

ALMARIO, Rogelio U., BUCHAN, Wendy M., ROCKE, David M., KARAKAS, Sidika E. (2017) - **Glucose-lowering effect of whey protein depends upon clinical characteristics of patients with type 2 diabetes**. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 5(1) 1-9.

ALMEIDA, Domingos. (2006) - **Manual de Culturas Hortícolas: Volume II**. 1ª edição. Lisboa: Editorial Presença. ISBN 972-23-3568-5.

ALVES, Inês. (2009) - **Avaliação de alternativas para pré-tratamento de efluentes de indústrias agro-alimentares**. Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. [consulta a 17 de novembro de 2017]. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/59133>

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. (1993) - **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ISSN 0027-8424. 90(17), 7915-7922.

APDP (Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal) (2017) - **Diabetes Mellitus**. [consulta a 15 de abril de 2018]. Disponível em <http://portaldadiabetes.pt/diabetes/a-pessoa-com-diabetes/o-que-e-a-diabetes>

ARTYM, Jolanta; ZIMECKI, Michał. (2013) - **Milk-derived proteins and peptides in clinical trials**. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 67, 800-816.

AZEVEDO, Beatriz. (2015) - **Ultrafiltração de Concentrados de Soro de Leite de Mistura para Fabrico de Requeijão**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química. Instituto Superior Técnico de Lisboa. [consulta a 20 de setembro de 2017]. Disponível na internet: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/563345090414667/dissertacao.pdf>

AZEVEDO, C.A; AZEVEDO, L.A; COSTA C.M; LIMA, S.F; LINS, M.F; VEIGA, R. L. (2014) - **Soro do leite e os danos causados ao meio ambiente**. X Encontro Brasileira de Adsorção. [consultado a 22 de dezembro de 2017]. Disponível na internet: http://www2.unifesp.br/home_diadema/eba2014/br/resumos/R0038-1.PDF

BAETA, Mónica. (2014) - **Subprodutos da indústria de hortofrutícolas minimamente processados: caracterização e valorização do potencial bioativo e energético**. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar-Processamento de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Lisboa. [consulta a 13 de março de 2018]. Disponível na internet: https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/6791/.../TeseMónica_versao_final.pdf

BAKER, ETTY B.; WELLMAN, NANCY S. (2005) - **Nutrition concerns in discharge planning for older adults: A need for multidisciplinary collaboration**. Journal of the American Dietetic Association. 105 (4), 603-607.

BAPTISTA, PEDRO; CAMPOS, INÊS; PIRES, IVA; VAZ, SOFIA. (2012) - **Do Campo ao Garfo, Desperdício Alimentar em Portugal**. 1ª ed. Lisboa: CESTRAS. ISBN 978-989-20-3438-6.

BARBA, A.I.O., HURTADO, M.C., MATA, M.C.S., RUIZ, V.F. TEJADA M.L.S. (2006) - **Application of a UV-vis detection- HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables**. Food Chemistry. 95, 328-336.

BARIMAH, JOHN; YANNEY, PERPETUAL; LARYEA, DAMIAN AND QUARCOO, COLLINS. (2017) - **Effect of Drying Methods on Phytochemicals, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Dandelion Leaves**. American Journal of Food and Nutrition. 5(4), 136-141.

BERNSTAD, ANNA KARIN [et al]. (2016) - **Consideration of food wastage along the supply chain in lifecycle assessments: A mini-review based on the case of tomatoes**. Waste Management & Research. 35(1), 29-39.

BOJÓRQUEZ, Reyna María Cruz; GALLEGO, Javier González; COLLADO, Pilar Sánchez. (2013) - **Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno.** *Nutrición Hospitalaria*. 28(1), 6-15.

BORRALHO, André. (2015) - **Contribuição para o desenvolvimento de suplemento alimentar proteico e antioxidante produzido a partir de subprodutos da indústria alimentar.** Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. [consulta a 3 de setembro de 2017]. Disponível em <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/31066/1/Tese%20Andre%20Borralho.pdf>

BRIMELOW, Rachel E., [et al]. (2017) - **A role for whey-derived lactoferrin and immunoglobins in the attenuation of obesity-related inflammation and disease.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(8), 1593-1602.

BURTON-FREEMAN, B.M. [et al]. (2012) - **Protective activity of processed tomato products on postprandial oxidation and inflammation: a clinical trial in healthy weight men and women.** *Molecular Nutrition and Food Research*. 56(4), 622-631.

BURTON-FREEMAN, Britt M.; SESSO, Howard D. (2014) - **Whole Food versus Supplement: Comparing the Clinical Evidence of Tomato Intake and Lycopene Supplementation on Cardiovascular Risk Factors.** *American Society for Nutrition*. 5, 457-485.

CAPURSO, Cristiano; VENDEMIALE, Gianluigi. (2017) - **The Mediterranean Diet Reduces the Risk and Mortality of the Prostate Cancer: A Narrative Review.** *Frontiers in Nutrition*. 4(38), 1-14.

CARDOSO, Daniela. (2016) - **Microbiota, Probióticos e Saúde.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Medicina. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. [consulta a 19 de abril de 2018]. Disponível em <https://eg.uc.pt/bitstream/10316/33711/1/tese%20Daniela%20Cardoso.pdf>

CARIS-VEYRAT, C. [et al]. (2004) - **Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (21), 6503-6509.

CASTRO, Virginia. (2003) -

CHOI, Suk Hyun [et al]. (2014) - **Protein, free amino acid, phenolic, b-carotene, and lycopene content, and antioxidative and cancer cell inhibitory effects of 12 greenhouse-grown commercial cherry tomato varieties.** Journal of Food Composition and Analysis. 34(2), 115-127.

CODEX ALIMENTARIUS. (2008) - **Codex Standard for Tomatoes.** Codex Stan 293. 1-5. [consulta a 21 de maro de 2018]. Disponível em http://www.fao.org/faowhocodexalimentarius/shproxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%2BSTAN%2B293-2008%252FCXS_293e.pdf

CORREIA, Alexandra; MONTEZ, Rita; Rosa Da Silva, Gonçalo. (2016) - **Millennials: geração que vem revolucionar o capitalismo,** Visão, [consulta a 22 de fevereiro de 2017], disponível em <http://visao.sapo.pt/actualidade/sociedade/2016-09-23-Millennials-A-geracao-que-vem-revolucionar-o-capitalismo>

COSTA, Daniela e SANTOS, Rita. (2017) - **Toal Ecobebidas.** Dossiê de apresentação para prémio Ecotrophelia 2017- PortugalFoods. [consulta a 20 de abril de 2018].

COSTA, Djamilia. (2011) - **Caracterização e Tratamento de Efluentes Resultantes da Atividade de Produção de Queijo.** Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente- perfil Engenharia Sanitária. [consulta a 15 de fevereiro de 2018]. Disponível em https://run.unl.pt/bitstream/10362/5661/1/Costa_2011.pdf

COSTA, Eurico. (2009) - **Impacto de descargas de efluentes agro-alimentares nas ETAR da ATMAD.** Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente - especialização em gestão. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. [consulta a 20 de fevereiro de 2018]. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/58324/1/000137350.pdf>

COSTA, Francelina. (2009) - **Avaliação da composição em micronutrientes do tomate consoante a variedade e modo de colheita.** Dissertação de Mestrado em Nutrição Clínica. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. [consulta a 20 de setembro de 2017]. Disponível em https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/13503/1/Tese_mestrado_Francelina%20Costa.pdf

COSTA, Francelina [et al]. (2011) - **Evolution of Mineral Contents in Tomato Fruits During the Ripening Process After Harvest**. Food Analytical Methods. 4(3), 410–415.

COSTA, Francelina. [et al]. (2013) - **Lycopene in tomato fruits and its content variation during the ripening process after harvest**. Nova Science Publishers. 13, 233-252.

COVAS, António; COVAS, Maria. (2015) - **A dieta mediterrânica – a criação de uma cadeia de valor multifuncional**. Para uma nova inteligência territorial no rural tradicional algarvio. Uma abordagem exploratória. Centro de Estudos de Geografia e Ordenamento do Território (GOT). 1(7), 111-128.

Decreto-Lei n.º 62/2017: **AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL**. Diário Da República. 1.º série, nº112, (junho 2017), p. 2924 - 2944. [consulta a 1 de junho de 2018]. Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/107495709>

DIREÇÃO - GERAL DE SAÚDE (DGS) (2018) - **Morangos**. [consulta a 12 de junho de 2018]. Disponível em <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/alimento/morangos/>

DIAS, Tiago [et al]. (2014) - **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfo genéticos**. Revista Ciência Rural, Santa Maria. 1-6. [consulta a 11 de maio de 2018]. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/cr/2015nahead/1678-4596-cr-cr20140098.pdf>

DÍAZ, Olga Rubio; PEREIRA, Carlos D.; COBOS, Angel. (2009) - **Aplicaciones de los Concentrados Y Aislados de Proteínas de Lactosuero en la Industria Alimentaria**. Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos. 108-115.

DELGADO-VARGAS, F., Jiménez, A. R. e Paredes-López, O. (2000) - **Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains -Characteristics, biosynthesis, processing, and stability**. Critical Review in Food Science and Nutrition. 40(3), 173-289.

DOMINGOS, Sandra. (2009) - **Valorização do Tomate: Extração supercrítica de compostos bioativos a partir de repiso**. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa. [consulta a 15 de março de 2018]. Disponível em <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2086/.../Tese%20SandraDomingos.pdf>

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. (2011) - **Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol.** Food Chemistry. 110(1), 76–82.

FAO. (2009) - **Food and Agricultural commodities production.** [consulta a 3 de fevereiro de 2018]. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

FAO. (2017) - **ONU: após uma década de queda, a fome volta a crescer no mundo em 2016,** [consulta a 27 de dezembro de 2017]. Disponível em <https://nacoesunidas.org/onu-apos-uma-decada-de-queda-fome-volta-a-crescer-no-mundo/>

FERREIRA, Sila. (2004) - **Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* mill.) cultivado nos sistemas convencional e orgânico comercializado na região metropolitana de Curitiba.** Tese para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. 43-51. [consulta a 12 de fevereiro de 2018]. Disponível em <dspace.c3sl.ufpr.br/bitstream/1884/659/1/FERREIRA-2004-DEF.pdf>

FLANDRIN, Jean-Louis; MONTANAR, Massimo. (1998) - **Historia de la alimentación.** Espanha: edição Trea. ISBN 89-9704-145-3. 248/ 289 a 300.

FRANÇOSO, Iara; COUTO, Meylene; CANNIATTI-BRAZACA, Solange; ARTHUR, Valter. (2008) - **Physical-chemical alterations in irradiated and stored strawberries (*Fragaria anassa* Duch).** Ciência e Tecnologia de Alimentos. 28(3), 614 a 619.

FRIEDMAN, M. (2013) - **Anticarcinogenic, Cardioprotective, and Other Health Benefits of Tomato Compounds Lycopene, α -Tomatine, and Tomatidine in Pure Form and in Fresh and Processed Tomatoes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(40), 9534-9550.

GEORGE, Binoy. [et al]. (2004) - **Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype.** Food Chemistry. 84, 45-51.

GEOIRGE, Stephane [et al]. (2011) - **Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamina C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes.** Food Chemistry. 124(4), 1603-1611.

GOBALLAB (2013) – **POQ II: Determinação do Teor de Proteína Bruta.** [consulta a 18 de setembro de 2018]. Disponível em

https://www.iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/1081/5/Anexo%20IV_POQ%2011%20-%20Prote%C3%ADna.pdf.

GOUVEIA, Luís Ricardo. (2016) - **Produtos lácteos fermentados à base de soro de leite de ovino** – Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Superior de Coimbra. [consulta a 20 de outubro de 2017]. Disponível em https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:f_iSIPzgMUJ:https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/18379+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt

GOVERNO DE PORTUGAL. (2014) - **Prevenir o desperdício alimentar: um compromisso de todos**. Lisboa. [Consulta a 22 de dezembro de 2017]. Disponível na internet: http://www.apiam.pt/images/newsbreve/ficheiro/73_desperdicio_alimentar.pdf

GUPTA, Rockendra [et al]. (2011) - **Combined Pressure – Temperature Effects on Carotenoid Retention and Bioaccessibility in Tomato Juice**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(14), 7808-7817.

HALLMANN, Ewelina; LIPOWSKI, Janusz; MARSZALEK, Krystian and REMBIALKOWSKA, EWA. (2013) - **The Seasonal Variation in Bioactive Compounds Content in Juice from Organic and Non- Organic Tomatoes**. Plant Foods and Human Nutrition. 68(2), 171-176.

HANCHAR, Alena. (2017) - **Avaliação Quantitativa do Desperdício Alimentar: Case Study. trabalho de investigação**. 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. [consulta a 9 de abril de 2018]. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/107260/2/211782.pdf>

HARAGUCHI, Fabiano; ABRÉU, Cesar; DE PAULA, Heberth. (2006) - **Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana**. Revista de nutrição. 19(4), 479-488.

HENRIQUES, Marta; PEREIRA, Carlos D.; GIL, Maria. (2011) - **Characterization of Bovine and Ovine WPC Obtained by Different Membrane Configuration Processes**. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 5(4), 316-324.

HINRICHS, Jörg. (2004) - **Mediterranean milk and milk products**. European Journal Nutrition. 43(1), 1-17.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. (1999) - **Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability**. Food and Chemical Toxicology. 37(9-10), 937-942.

HORVITZ, M.A.; SIMON, P.W. e TANUMIHARDJO, S.A. (2004) - **Lycopene and β -carotene are bioavailable from lycopene 'red' carrots in humans**. European Journal of Clinical Nutrition. 58(5), 803-811.

HWANG, Eun-Sun; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, Maria e BOWEN, Phyllis E. (2012) - **Effects of Heat Treatment on the Carotenoid and Tocopherol Composition of Tomato**. Journal of Food Science. 77(10), 1109-1114.

INE, Instituto Nacional de Estatística. (2015) - **Estatísticas Agrícolas 2014**. [Consulta a outubro de 2017]. Disponível em https://www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui=232758675&att_display=n&att_download=yEstatísticas Agrícolas 2014

INE, Instituto Nacional de Estatística. (2016) - **Estatística da Produção e Consumo de Leite 2015**. [Consulta a 2 de janeiro de 2018]. Disponível em https://www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui=274314683&att_display=n&att_download=y

JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA - Diretiva (UE) 2015/2203 do parlamento europeu e do conselho de 25 de novembro de 2015 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes a caseínas e caseinatos destinados à **alimentação humana**. [consulta a 21 de janeiro de 2017]. Disponível em <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015L2203&from=PT>

KOLEVA, Irina I. (2007) - **New methods for the screening of antioxidants in three Sideritis species**. Thesis Wageningen University. ISBN: 978-90-8504-685-1.

KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, M. (2003) - **Tomatine, chlorophyll, β -carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturation**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83(3), 195-200.

KUSKOSKI, E. Marta [et al]. (2005) - **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos**. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. 25(4), 726-732.

LEONARDI, C; AMBROSINO, P; ESPOSITO, F e FOGLIANO, V. (2000) - **Antioxidative Activity and Carotenoid and Tomatine Contents in Different**

Typologies of Fresh Consumption Tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(10), 4723-4727.

LUCERA, Annalisa, [et al]. (2018) - **Fruit and Vegetable By-Products to Fortify Spreadable Cheese.** Antioxidants. 7(61), 2-10.

MADEIRA, Ana. (2015) - **Extração e quantificação de carotenoides provenientes de diferentes cultivares de *CAPSICUM ANNUM L.* com interesse para a indústria farmacêutica.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências de Saúde. Universidade Fernando Pessoa. [consulta a 2 de maio de 2018]. Disponível em https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5150/1/PPG_19740.PDF

MARQUES, Cláudia. (2015) - **O Licopeno como composto bioativo do tomate.** Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Tecnologia Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu. Março. [consulta a 1 de setembro de 2018].

MARQUES, Filipa. (2017) - **Efeito da ingestão de um sumo de tomate na frequência cardíaca de repouso, pressão arterial de repouso e grau de percepção da recuperação em atletas de natação de competição.** Trabalho para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica pelo instituto Superior de ciências da Saúde Egas Moniz. [consulta a 16 de dezembro de 2017]. Disponível <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/18711>

MARTÍ, Raúl; ROSELLÓ, Salvador; CEBOLLA-CORNEJO, Jaime. (2016) - **Tomato as source of Carotenoids and Polyphenols targeted to cancer prevention.** Cancers. 8(6), 1-28.

MARTÍNEZ-VALVERDE, Isabel [et al]. (2002) - **Phenolic compounds, lycopene and antioxidante activity in comercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*).** Journal of the Science of Food and Agriculture. 82(3), 323-330.

MARTINS, Cristiana. (2018) - **Filme ativo com extrato de chá verde na preservação de alimentos suscetíveis à oxidação lipídica.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Fevereiro. [consulta a 30 de abril de 2018].

MARTINS, Ilda. (2006) - **Tabela da Composição dos Alimentos. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição** - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa. ISBN 972-8643-19-5. 92-95.

MANTOVANI, José R.; CARRERA, Marciza; LANDGRAF, Paulo R.C.; MIRANDA, José M. (2015) - **Soro ácido de leite como fonte de nutrientes para o milho**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 19(4), 324-329.

MATTAR, Rejane; MAZO, Daniel. (2010) - **Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular**. Revista Associação Médica Brasileira. 56(2), 230-236.

MELO, Enayde, [e atl]. (2006) - **Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas**. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. 26(3), 639-644.

MIGLIORI, Carmela, [et al]. (2012) - **Effects of organic farming and genotype on alimentary and nutraceutical parameters in tomato fruits**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92(14), 2833-2839.

MILLER, H. E. (1971) - **A simplified method for the evaluation of antioxidants**. Journal of the American Oil Chemists Society. 48(2), 91.

MINEIRO, Soraia. (2014) - **Fibra Alimentar: Composição, métodos e implicações alimentares**. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. [consulta a 22 de abril de 2018]. Disponível em https://run.unl.pt/bitstream/10362/16070/1/Mineiro_2014.pdf

MONTEIRO, Cristiane, [et al]. (2008) - **Qualidade nutricional e antioxidante do tomate “tipo italiano”**. Alimentos e Nutrição. 19(1), 25-31.

MOREIRA, Mariana. (2012) - **Consumo Consciente: Sensibilização para a Importância do Desperdício Alimentar**. Trabalho de investigação- 1º ciclo em Ciências da Nutrição, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. [consulta a 9 de fevereiro de 2018]. Disponível em https://sigarra.up.pt/fmup/en/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=14189.

MOURA, A.P. (2011) - **Consumo Alimentar Sustentável**. Universidade de Aberta. [consulta a 1 de junho de 2018]. Disponível em <https://repositorioaberto.uab.pt/handle/10400.2/5428>

MOURE, André [et al]. (2001) - **Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds**. Food Internation Research. Vol34(2-3), 103-109.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. (2004) - **Extraction and analysis of phenolics in food.** Journal of Chromatography A. 1054, 95-111.

NELLIS, Stéfani; CORREIA, Angela; SPOTO, Marta. (2017) - **Extração e quantificação de carotenoides em minitomate desidratado (Sweet Grape) através da aplicação de solventes.** Brazilian Journal of Food Technology. 20, 1-5.

Nemésio, Rodrigo (2013) - **Estilos alimentares e a saúde- caso específico dos países do Sul da Europa.** Dissertação para obtenção do grau de mestre no ciclo de estudos Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Medicina. [consulta a 25 de março de 2018]. Disponível em <https://core.ac.uk/download/pdf/144048461.pdf>

NOBRE, Beatriz P., [et al]. (2012) - **Supercritical Extraction of Lycopene from Tomato Industrial Wastes with Ethane.** Molecules.17(7), 8397-8407.

NORMA PORTUGUESA, 471. (1983) - **Leite e Leites compostos: Determinação do teor em iões cloreto.** Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NORMA PORTUGUESA, NP 475. (1983) - **Leite e leites compostos: Determinação da matéria gorda.** 1ª edição. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NORMA PORTUGUESA, NP 477. (1983) - **Leite e leites compostos: Determinação da cinza total.** 2ª edição. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NORMA PORTUGUESA, NP 872. (1983) - **Alimentos: Determinação da cinza total.** 2ª edição. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NORMA PORTUGUESA, NP 913. (1983) - **Leite concentrado. Determinação do teor de proteína bruta.** 2ª edição. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NORMA PORTUGUESA, NP 1224. (1983) - **Carne, derivados e produtos cárneos: Determinação da matéria gorda livre.** 2ª edição. Caparica, Portugal: Direção Geral da Qualidade, Instituto Português da Qualidade.

NUNES, Maria Antónia (2012) - **Determinação da capacidade antioxidante e parâmetros físico-químicos em smoothies: estabilidade ao longo do tempo de armazenamento.** Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências exatas e naturais. Faculdade de Ciência da Universidade do Porto. [consulta a 3 de março de 2018]. Disponível em <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:FdjYLIPVolJ:https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/65473+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt>

OBSERVADOR. (2016) - **Portugal: o 3º maior produtor de tomate da União Europeia.** [consultada a 28 de outubro de 2017]. Disponível em <http://observador.pt/2016706/22/portugal-e-3-o-produtor.de-tomate-na-uniao-europeia>

O' KENNEDY, Niamh; RAEDERSTOFF, Daniel; DUTTAROY, Assim K. (2017) - **Fruitflow: the first European Food Safety Authority-approved natural cardio-protective functional ingrediente.** European Journal Nutrition. 56(2), 461-482.

OLIVEIRA, A. C. De [et al.]. (2009) - **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Química Nova. 32(3), 689-702.

OMS - **Cancro matou 8.8 milhões de pessoas em todo o mundo em 2015.** [Consultada a 6 de novembro de 2017]. Disponível em <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>

OMS, (2016). - **Conceito de Saúde.** [Consulta a 13 de setembro de 2017]. Disponível em <http://cemi.com.pt/2016/03/04/conceito-de-saude-segundo-oms-who/>

OMS. (2002) - **Régime alimentaire, nutrition et prévention des maladies chroniques - Rapport d'une Consultation OMS/FAO d'experts.** Suíça: Genebra, Organização Mundial de Saúde. ISBN 92-4-220916-3. [Consulta a 13 de setembro de 2017]. Disponível na internet: http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_916/fr/

PARTIDÁRIO, Ana, [et al.]. (2014) - **A Dieta Mediterrânica em Portugal: Cultura, Alimentação e Saúde.** Faro: Univeridade do Algarve. ISBN 978-989-8472-51-9. 61 e 93.

PEREIRA, Ana Maria. (2013) - **Hábitos Alimentares: uma reflexão histórica.** Revista Nutricias. (18), 18-20.

PEREIRA, Carlos D. (2014) - **Processo de produção de produtos lácteos fermentados à base de concentrados líquidos de proteínas de soro- Patente**

107016. [Consulta a 22 de novembro de 2017]. Disponível na internet: https://www.researchgate.net/publication/266740416_Processo_de_producao_de_produtos_lacteos_fermentados_a_base_de_concentrados_liquidos_de_proteinas_de_soro.

PÉREZ- RIMENÉZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. (2006) - **Effect of solvent and certain food constituents on diferente antioxidant capacity assays**. Food Research International. 39(7), 791-800.

PERVEEN, Rashida. [et al]. (2015) - **Tomato (*Solanum lycopersicum*) carotenoids and lycopenes chemistry; metabolismo, absorption, nutrition, and allied helth claims- a comprehensive review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 55(7), 919-929.

PIENIZ, Simone. [et al]. (2009) - **Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de frutas e hortaliças**. Ciências Agrotecnológicas. 33(2), 552-559.

PINHO, Inês. [et al]. (2015) - **Perfil dos consumidores face ao desperdício e reaproveitamento de hortofrutícolas em ambiente doméstico**. Acta Portuguesa de Nutrição. (2), 8-12. [consulta a 12 de fevereiro de 2018]. Disponível em www.scielo.mec.pt/pdf/apn/n2/n2a02.pdf

PINS, JJ.; KEENAN, JM. (2004) - **The effects of a hydrolyzed whey protein supplement (Biozate® I) on ACE activity and bradykinin**. 64ª Sessões Científicas Anuais da Associação Americana de Diabetes. [consulta a 20 de janeiro de 2018]. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000105&pid=S14155273200600040000700040&lng=es

PMA. (2016). - **Relatório Nutricional Global**. [Consulta a 22 de novembro de 2017]. Disponível em <https://nacoesunidas.org/um-terco-da-populacao-mundial-esta-desnutrida-ou-com-excesso-de-peso-diz-estudo/>

PORTUGALFOODS. (2017). [Consulta a 25 de novembro de 2017]. Disponível em URL: <https://www.portugalfoods.org/>

PREGO, R., Duarte. [et al]. (2002) - **Estudos Sobre Contaminação Ambiental na Península Ibérica**. 1ªed. Lisboa: Instituto Piaget. ISBN 9789727716210.

RAIOLA, Assunta, [et al]. (2014) - **Enhacing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food**. Revista Mediators Inflammation. 2014, 1-10.

RAIOLA, Assunta. [et al]. (2015) - **Vitamin E Content and Composition in Tomato Fruits: Beneficial Roles and Bio-Fortification**. International Journal of Sources Molecular Sciences. 16(12), 29250-29264.

RE, Roberta; BRAMLEY, Peter; RICE-EVANS, Catherine. (2002) - **Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean Tomato variety**. Free Radical Research. 36(7), 803-810.

REVISTA BUSINESS PORTUGAL (2017) - **Hortípor: Produtor de Tomate em Portugal garante produção o ano inteiro**._Edição nº18. [consulta: a 9 de outubro de 2017]. Disponível em <http://revistabusinessportugal.pt/hortipor-produtor-de-tomate-em-portugal-garante-producao-o-ano-inteiro/>

ROCA, Miguel Gama Gaspar Da. (2009) - **Valorização do tomate nacional: Extracção de licopeno por CO2 supercrítico a partir de repiso de tomate**. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa. [consulta a 16 de abril de 2018]. Disponível em <https://www.repository.utl.pt/...5/.../Valorização%20do%20Tomate%20Nacional.pdf>

RODRIGUEZ-AMAYA, Della B. (2001) - **A Guide to carotenoid Analysis in foods**. 1ª edição. United States of America, Judith Dickson. 16-19. [consulta a 23 de maio de 2018]. Disponível na internet: <http://beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/A-guide-to-carotenoid-analysis-in-foods.pdf>

ROYTE, E. (2014) - **O preço do desperdício da comida**. National Geographic Portugal. [Consulta a 23 de dezembro de 2017]. Disponível na internet: <https://nationalgeographic.sapo.pt/historia/grandes-reportagens/256-o-preco-do-desperdicio-de-comida?start=1>

SALDANHA, Helena. (1999) - **Nutrição Clínica**. Lisboa:LIDEL. ISBN 972-757-103 4.

SAMARAS, Antonios [et al]. (2014) - **Effect of a special carbohydrate–protein bar and tomato juice supplementation on oxidative stress markers and vascular endothelial dynamics in ultra-marathon runners**. Food and Chemical Toxicology. 69, 231-236.

SARTI, Flávia. [et al]. (2017) - **Influência do ambiente de trabalho sobre consumo alimentar, estado de saúde e produtividade de tripulantes de aeronaves de uma companhia de aviação civil brasileira**. XX SEMEAD- Seminários em Administração. [consulta a 20 de janeiro de 2018]. Disponível

em http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:_GQ6ON7OwJ:www.revistas.u.br/rgpp/article/view/133194+&cd=1&hl=ptPT&ct=clnk&gl=pt

SAVI, Patricia [et al]. (2017) - **Analysis of total flavonoids present in some of the most consumed conventional and organic fruits and vegetables in southern Brazil**. Demetra: Alimentação, Nutrição e saúde. 12(1), 275-287.

SCHUBERT, Maycon; SCHNEIDER, Sergio. (2016) - **Construção social de mercados e as tendências de consumo: o caso do Pavilhão da Agricultura Familiar da EXPOINTER (RS)**. Ciências Sociais Unisinos. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Brasil. 52(3), 373-382. [Consulta a 3 de novembro de 2017]. Disponível em na internet: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/163510>

SHI, J., MAGUER, M. L. e BRYAN, M. (2002) - **Lycopene from tomatoes**. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. Florida, Boca Raton: CRC Press. 2, 135-168.

SHIMAMURA, Tomoko, [et al]. (2014) - **Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidante capacity of food additives – inter-laboratory evaluation study**. Analytical Sciences. 30(7), 717-720.

SIDDIQUI, Mohammed W, AYALA-ZAVALA, J.F, DHUA, R.S. (2015) - **Genotypic variation in tomatoes affecting processing and antioxidante attributes**. Food Science and Nutrition. 55(13), 1819-1835.

SIDDIQUI, Nazish [et al]. (2017) - **Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (Nepeta bracteata Benth)**. Journal of Taibah University Medical Sciences.12(4), 360-363.

SILVA, Marília; COSTA, Renata; SANTANA, Andréa; KLOBITZ, Maria. (2010) - **Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products**. Semina Ciências Agrárias. 31(3), 669-682.

SIMÕES DE CARVALHO, Maria Carlota. (2012) - **Estudo da evolução de carotenos e de açúcares em tomate cereja**. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Universidade de Aveiro. [consulta a 15 de março de 2018]. Disponível em <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/10172/1/6676.pdf>

SLAVOV, Aleksandar Kolev. (2017) - **General Characteristics and Treatment Possibilities of Dairy Wastewater- A Review**. Food Techonology. 55(1), 14-28.

SPAARGAREN, Gert; OOSTERVEER, Peter. (2010) - **Citizen-Consumers as Agents of Change in Globalizing Modernity: The Case of Sustainable Consumption.** Journal Sustainability. 2, 1887-1908.

SUÁREZ, M. H., RODRÍGUEZ, E.M.R., ROMERO, C.D. (2007) - **Mineral and trace element concentrations in cultivars of tomatoes.** Food Chemistry. 104, 489-499.

SUCUPIRA, Natália. [et al]. (2012)- **Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits.** UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde. 14(4), 263-269.

TAKEOKA, Gary R. [et al]. (2001) - **Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes.** Journal Agricultural and Food Chemistry. 49(3), 3713-3717.

TAVARES, Tânia G, [et al]. (2012) - **Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process.** Journal of Food Engineering. 110(4), 547 a 552.

THÜRMAN, Petra A. [et al]. (2002) - **Plasma concentration response to drinks containing β -carotene as carrot juice or formulated as a water dispersible powder.** European Journal of Nutrition. 41. 228 a 235.

TOOR, Ramandeep K. and SAVAGE, Geoffrey P. (2005) - **Antioxidant activity in different fractions of tomatoes.** Food Research International. 38, 487- 494.

TREJO-SOLIS, Cristina, [et al]. (2013) - **Multiple Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Lycopene in Cancer Inhibition.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-18. [consulta: 1 de março de 2018]. Disponível em <http://www.biomedsearch.com/attachments/00/23/97/09/23970935/ECAM2013705121.pdf>

UNLU, N.Z. [et al]. (2005) - **Carotenoid Absorption from Salad and Salsa by Humans Is Enhanced by the Addition of Avocado Oil.** The Journal of Nutrition. 135, 431-436.

VELOSO, Rita. (2016) - **Variedades: tendência do tomate: cherry e cherry preto.** Vida Rural. [consulta a 14 de junho de 2018]. Disponível em <https://www.vidarural.pt/insights/variedades-tendencia-do-tomate-cherry-e-cherry-preto/>

VIUDA- MARTOS, M. [et al]. (2014) - **Tomato and Tomato Byproducts. Human Health Benefits of lycopene and its application to meat products: a review.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54(8), 1032-1049.

VIVEIROS, Clara. (2012) - **Estudo do comportamento alimentar, preferências alimentares e neofobia alimentar em crianças pré-escolares e da eficácia de um programa de promoção de comportamentos alimentares saudáveis em contexto escolar: um estudo exploratório**. Dissertação para obtenção do grau de mestre em psicologia. Faculdade de Psicologia da Universidade de Lisboa. [consulta a 6 de abril de 2018]. Disponível em <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:DIpmR8AxTQwj:repositorio.ul.pt/handle/10451/8063+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt>

VIZZOTTO, M. [et al]. (2012) - **Atividade antioxidante, fenóis e carotenoides de diferentes tipos de tomate cultivados sob sistema orgânico**. 4º Simpósio de Segurança Alimentar. [consulta a 1 de junho de 2018]. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/940707/1/0000000890tomateGramadoMarciaeJoseErnani.pdf>

YOO, K. M. [et al]. (2008) - **Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs**. Food Chemistry. 106(3), 929–936.

ZUÑIRA, Giraldo, [et al]. (2004) - **Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo**. Revista Instituto Lactínios Cândido Tostes. 59.

Anexos I.

| Parâmetro | Gama (mg/L) ⁽¹⁾ | MÉDIA | |
|--------------------------|----------------------------|---|---|
| | | Média Indústria Lacticínios (mg/L) ⁽¹⁾ | Média Indústria Queijos (mg/L) ⁽²⁾ |
| Sólidos Suspensos Totais | 24 – 5700 | - | 1100 |
| CQO | - | - | 12000 |
| CBO ₅ | 450 – 4790 | 1885 | 5400 |
| Óleos e Gorduras | - | - | 380 |
| Azoto | 15 -180 | 76 | 160 |
| Fósforo | 11 -160 | 50 | 110 |
| Sódio | 60 -807 | - | - |
| Cloreto | 48 – 469 | 276 | - |
| Cálcio | 57 -112 | - | - |
| Magnésio | 25 – 49 | - | - |
| Potássio | 11 -160 | 67 | - |
| pH | 4 -12 | 7,1 | - |

Composição das águas residuais da indústria queijeira (mg/L), (Costa, Eurico, 2011).

Anexo II.

| Parâmetros | Valores Máximos Admissíveis | Expressão dos Resultados |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| CBO ₅ a 20°C | 500 | mg O ₂ /l |
| CQO | 1000 | mg O ₂ /l |
| SST | 1000 | mg/l |
| pH | 5<ph<9 | - |
| Temperatura | <45 | °C |
| Óleos e gorduras | 250 | mg/l |
| Condutividade | 3000 | µS/cm |
| Cloretos totais | 150 | mg Cl/l |
| Boro | 1 | mg B/l |
| Arsénio total. | 0,5 | mg As/l |
| Chumbo total | 0,5 | mg Pb/l |
| Cianetos totais | 0,5 | mg CN/l |
| Cobre total | 1 | mg Cu/l |
| Crómio | | |
| -hexavalente | 2 | mg Cr (VI)/l |
| -trivalente | 2 | mg Cr (III)/l |
| Ferro total | 22,5 | mg Fe/l |
| Níquel total | 2 | mg Ni/l |
| Selénio total | 0,05 | mg Se/l |
| Zinco total | 5 | mg Zn/l |
| Mercurio | 0,05 | mg Hg/l |
| Prata | 1 | mg Ag/l |
| Cádmio | 0,2 | mg Cd/l |
| Metais pesados (total) | 10 | mg/l |
| Hidrocarbonetos totais | 50 | mg/l |
| Cloro residual disponível total | 2 | mg Cl ₂ /l |
| Fenóis | 1 | mg C ₆ H ₅ OH/l |
| Sulfuretos | 2 | mg S/l |
| Azoto amoniacal | 100 | mg NH ₄ /l |
| Detergentes (lauril-sulfato) | 50 | mg/l |

Valores legislados para as águas residuais industriais descarregadas para os coletores públicos pela Câmara Municipal de Celorico da Beira (Costa, Djamilia, 2011).

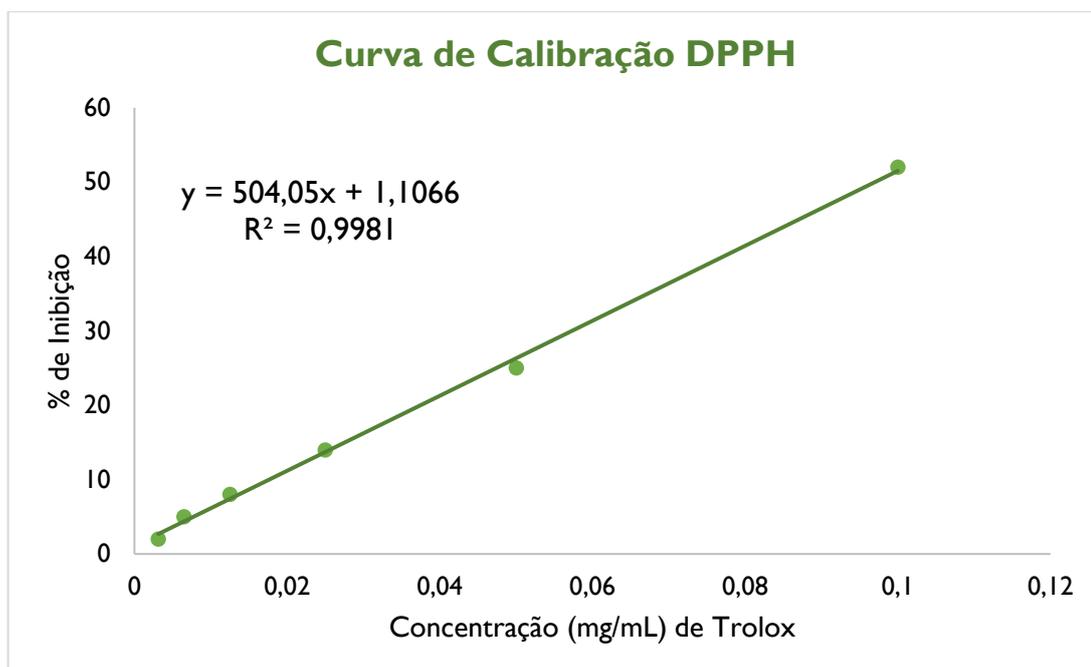
Anexo III.

| 10/01/ 2018 | 11/01/2018 | | | 12/01/2018 | 15/01/2018 | 16/01/2018 | |
|--|---|---|---|--|---|--|--|
| | Receita 1 | Receita 2 | Receita 3 | | Receita 4 | Receita 5 | |
| Fermentação das bases, proteica e açúcares (20 horas mínimo) | 1 tomate congelado; 1 cenoura 7 g sacarose; 100 mL de CLPS; | 1 tomate fresco; 45g de manga; 5g de sacarose; 100 mL de CLPS; Sumo de 1 laranja. | 1 tomate fresco; 1 cenoura; 10g de sacarose; 100 mL de CLPS. | Fermentação das bases, proteica e açúcares (20 horas mínimo) | 1 tomate fresco; 1 cenoura; Sumo de uma laranja; 3g de sumo de limão; 2,5 g de sacarose; | 1 tomate fresco; 45g de manga; Sumo de uma laranja; 3g de sumo de limão; 2,5 g de sacarose; 100 mL de CLPS. | |
| | 1 tomate congelado; 1 cenoura 7g de sacarose; 100 mL de PUFC. | 1 tomate fresco; 45g de manga; 5g de sacarose; 100 mL de PUFC; Sumo de 1 laranja. | 1 tomate fresco; 1 cenoura; 10g de sacarose; 100 mL de CLPS. | | 1 tomate fresco; 1 cenoura; Sumo de uma laranja; 3g de sumo de limão; 2,5 g de sacarose; 100 mL de PUFC. | 1 tomate fresco; 45g de manga; Sumo de uma laranja; 3g de sumo de limão; 2,5 g de sacarose; 100 mL de PUFC. | |
| | Provas: Tomate congelado demasiado verde e detém muita água. Mesmo com a cenoura não disfarça. | Provas: Com a adição de sacarose não se detetava nenhum sabor, ponto negativo, pois parecia um mero xarope. A adição também do sumo de laranja para o CLPS | Provas: sentia-se muita acidez da conjugação do tomate com a cenoura. | | Provas: Já não sabia tanto a xarope, mas continuava ácido. | Provas: Ficou bom, mas a manga encarece todo o processo. | |

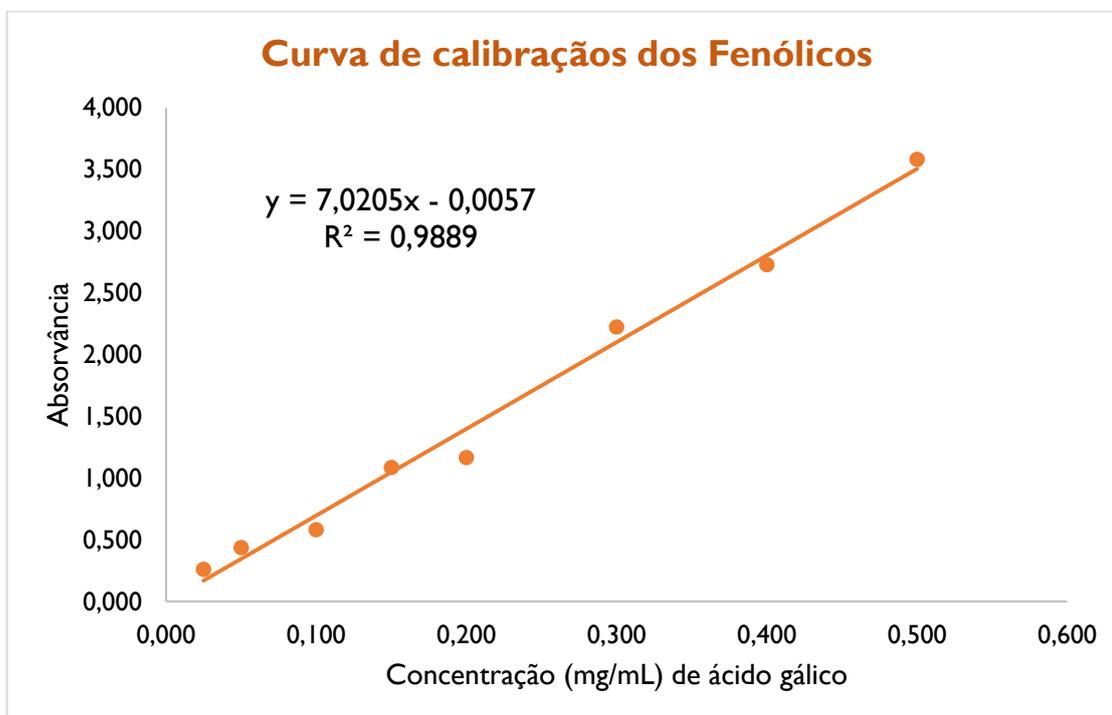
| 17/01/2018 | | 19/01/2018 | 23/01/2018 | |
|--|---|--|---|---|
| Receita 6 | Receita 7 | Receita 8 | Receita 9 | Receita 10 |
| ½ tomate fresco; 50 mL de sumo de maçã; 50 mL de CLPS; 1g sacarose; 1,5 g de sumo de limão; Sumo de ½ laranja. | ½ tomate fresco; 50 mL de sumo de cenoura; 50 mL de CLPS; 1g sacarose; 1,5 g de sumo de limão; Sumo de ½ laranja | ½ tomate fresco; ½ maçã; 50 mL de CLPS; 1g sacarose; 1,5 g de sumo de limão; | 1 tomate fresco de cacho; 1,5 g de sumo de limão; 100 mL de PUFC; | 1 tomate cacho; 1,5g de sumo de limão; 100 mL de PUFC; ½ maçã |
| ½ tomate fresco; 50 mL de sumo de maçã; 50 mL de PUFC; 1g sacarose; 1,5 g de sumo de limão; Sumo de ½ laranja | | ½ tomate fresco; ½ maçã; 50 mL de CLPS; 0g sacarose; 1,5 g de sumo de limão; | Receita 11 | Receita 12 |
| ½ tomate fresco; 50 mL de sumo de cenoura; 50 mL de PUFC; 1g sacarose; 1,5 g de sumo de limão; Sumo de ½ laranja, | | | 1 tomate fresco de cacho; 100 mL de CLPS; 1g de açúcar; 1,25g de sumo de limão; 1 laranja. | 100 mL de CLPS; 100 mL de sumo de tomate de cacho; 50 mL de sumo de cenoura; 1% de sal. |
| Provas: Fica muito agradável de se beber, mas já ocorria oxidação por parte da maçã. | Provas: Já não se notava os grumos da cenoura, visto que era sumo. Mas continuava a ser ligeiramente ácido. | Provas: A textura ficou mais de papa de fruta e o sabor não se apresentava intenso a nenhum dos frutos. | Provas: Na receita 9 o tomate predomina o sabor, para nós portugueses que não detemos esta gastronomia de sumo de tomate é desagradável. A receita 11 apresenta um sabor bastante agradável mascarado com a laranja inteira. | Provas: A receita 1e foi aquela que obteve uma maior recetividade por parte dos voluntários. Sendo selecionada como a formulação definitiva, pois os consumidores acharam que o sal cortava um pouco do sabor intenso do tomate. |

Tabelas correspondentes às formulações testadas dos produtos.

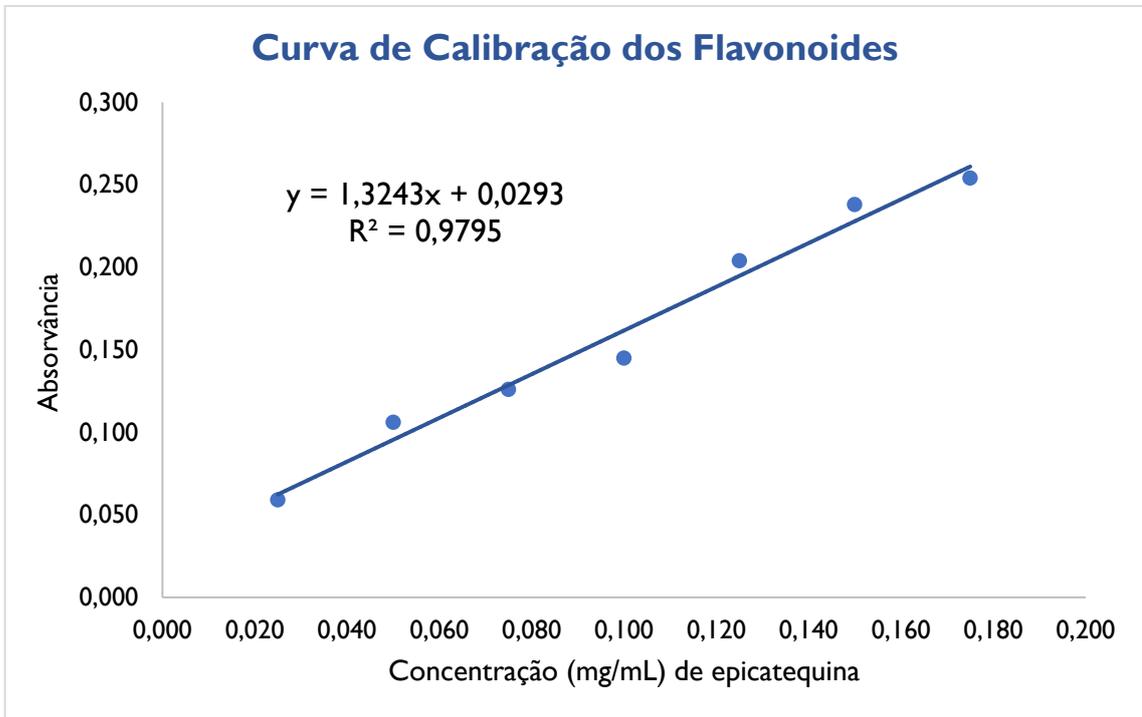
Anexo IV.



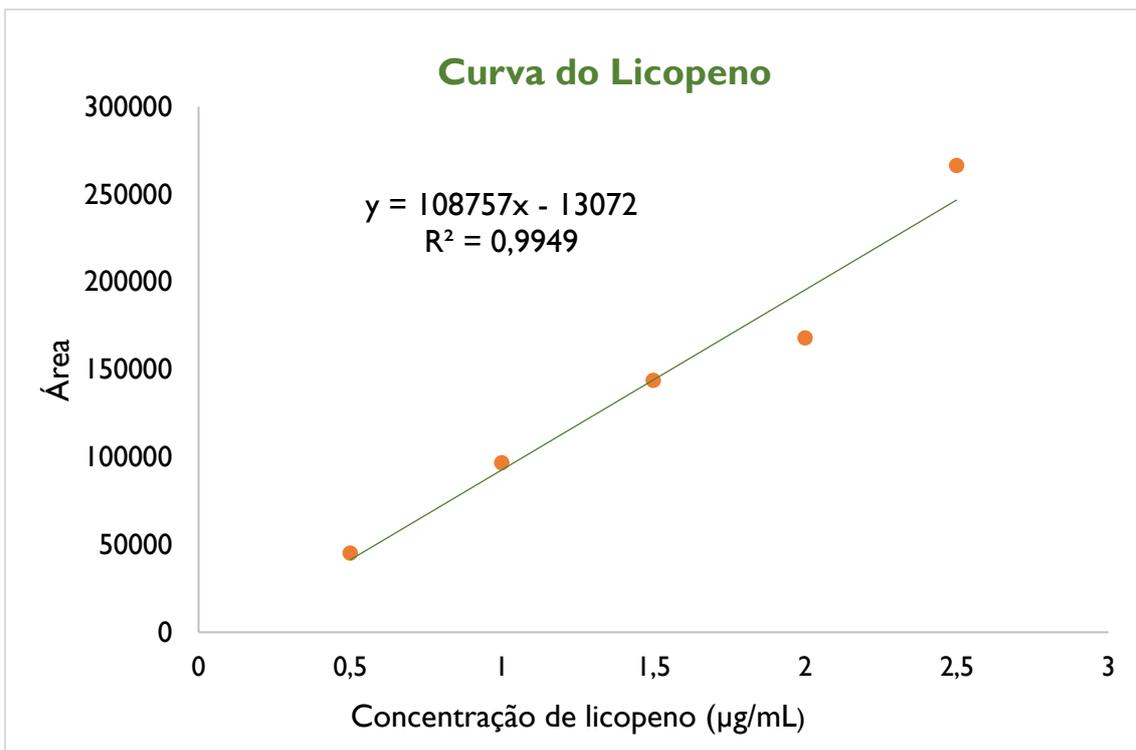
Anexo V.



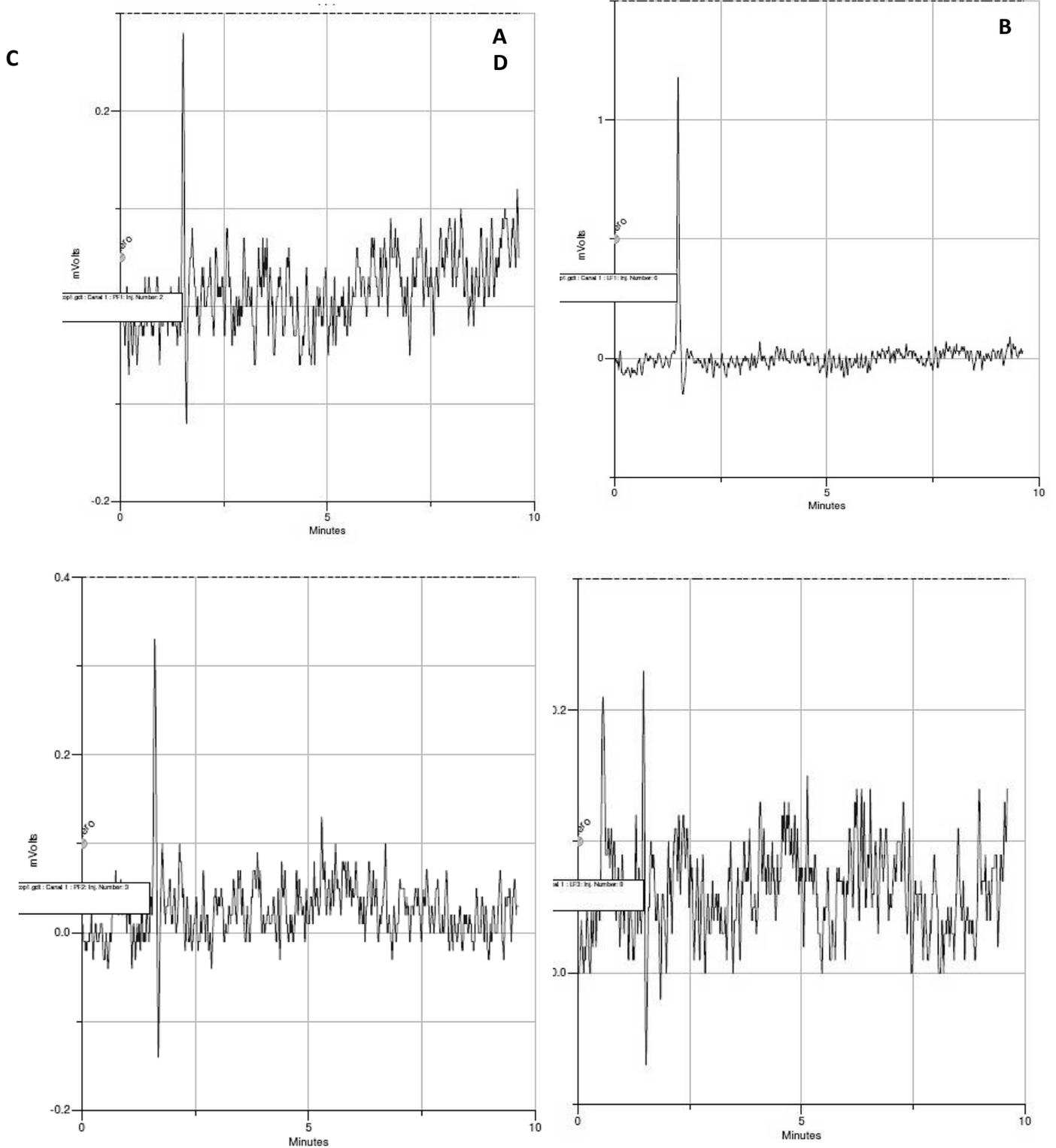
Anexo VI.



Anexo VII.



Anexo VIII.



A e B) cromatogramas da análise do licopeno no CLPS e PUFC após fermentação, respetivamente.

C e D) cromatogramas da análise do licopeno no CLPS e PUFC antes da fermentação, respetivamente.