



## **Bagas de Sabugueiro: Extração e aplicação no Iogurte**

**Sílvia Cavaleiro Pais**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientada por:  
**Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho**  
**Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias**

Bragança 2021



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Professora Doutora Letícia Estevinho, pela sua presença, disponibilidade, paciência, motivação, dedicação, esforço, apoio científico, ensinamentos e sobretudo pela confiança e amizade demonstrada.

Ao Professor Doutor Luís Dias, pela co-orientação, por todo o apoio científico, apoio no tratamento dos dados experimentais, paciência, amizade e disponibilidade durante a concretização deste trabalho.

À mestre Vanessa Paula, um agradecimento muito especial, pela orientação, pelos conhecimentos partilhados, pela disponibilidade tanto na parte laboratorial como na parte escrita, pela paciência, pelas palavras de força, pela amizade e carinho.

Aos meus pais, que são o meu maior apoio e motivação, por nunca me deixarem desistir e por acreditarem que sou sempre capaz de mais e melhor, por me tornarem todos os dias numa melhor pessoa e por serem os meus melhores amigos, sem eles nada disto teria sido possível.

Ao meu irmão, ao meu afilhado e a minha cunhada, por todas as palavras de apoio e conforto, por todo amor e amizade que me dão todos os dias.

À minha colega que se tornou amiga Natália Seixas, pela sua disponibilidade e ajuda, pela amizade e pelo companheirismo, pelo apoio e por nunca me deixar desistir, pelos bons momentos passados que ficarão na memória.

Ao meu namorado João, por ter sido o meu suporte ao longo desta caminhada, por todo o carinho, amor e companheirismo, e sobretudo por ser o meu melhor amigo.

À minha grande amiga Verónica, pela amizade e carinho, e por sempre me apoiar e interessar na realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, que diretamente ou indiretamente, me apoiaram e me mostraram o verdadeiro significado de amizade.

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Índice de figuras .....	vii
Lista de abreviaturas .....	ix
Resumo .....	x
Abstract.....	xii
Introdução geral.....	1
Objetivos.....	3
CAPÍTULO 1 .....	4
1.1 Iogurte.....	5
1.1.1 Produção do iogurte .....	5
1.1.2 Composição nutricional e química.....	8
1.1.3 Qualidade Do Iogurte .....	10
1.1.4 Microbiota do iogurte.....	11
1.2 Aditivos Alimentares .....	12
1.2.1 Aditivos Sintéticos .....	13
1.2.2 Aditivos Naturais.....	14
1.3. Baga do sabugueiro.....	15
1.3.1 Toxicidade e efeitos benéficos do sabugueiro.....	16
1.3.2 Sabugueiro Como Aditivo Natural.....	17
1.4. Compostos fenólicos.....	18
1.5 Flavonoides .....	19
1.6 Antocianinas .....	20
1.7 Propriedade antioxidante .....	21
1.8 Avaliação da qualidade microbiológica.....	22
1.8.1 Bolores e leveduras .....	22

1.8.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
1.8.3 Coliformes totais .....	24
1.8.4 <i>Escherichia coli</i> .....	24
1.8.5 <i>Salmonella</i> .....	25
1.8.6 Mesófilos e Psicrófilos .....	25
CAPÍTULO 2 .....	5
2.1 Amostragem .....	27
2.2 Tratamento da amostra .....	27
2.3. Otimização da extração dos compostos fenólicos .....	27
2.3.1. Preparação das soluções .....	28
2.3.2 Extração da baga de sabugueiro .....	29
2.4 Preparação do Iogurte com e sem baga de sabugueiro .....	31
2.5 Extratos dos iogurtes .....	32
2.6 Determinação de compostos fenólicos .....	33
2.6.1 Fenóis totais .....	33
2.6.2 Flavonoides totais .....	34
2.7 Atividade antioxidante .....	34
2.7.1 Metodologia FRAP .....	35
2.7.2 Análise do DPPH .....	35
2.8 Estabilidade microbiana e vida de prateleira .....	36
2.8.1. Preparação de amostras para análises microbiológicas .....	36
2.8.2. Bolores e leveduras .....	36
2.8.3. Contagem de Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i> .....	37
2.8.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	37
2.8.5. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
2.8.6. Contagem total de mesófilos totais e psicrófilos .....	38
2.9 Análise estatística .....	38

CAPÍTULO 3 .....	36
3.1 Métodos quantitativos.....	40
3.2 Otimização da extração hidro-etanólico .....	44
3.3 Iogurte com e sem extrato de baga de sabugueiro .....	47
3.4 Avaliação microbiológica dos iogurtes.....	56
CAPÍTULO 4 .....	58
5. Referências .....	61

## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Fluxograma do processo de produção do iogurte (Fonte: UFPR, 2006) .....	7
<b>Figura 2-</b> Estrutura molecular do sorbato de potássio. ....	14
<b>Figura 3-</b> Estrutura química básica dos compostos fenólicos. Fonte: (Alberti, 2014). .	19
<b>Figura 4-</b> Estrutura básica dos flavonoides (Fonte: Março et al. (2008)).....	19
<b>Figura 5-</b> Estrutura química dos principais flavonoides (Fonte: Março et al. (2008)). .	19
<b>Figura 6-</b> Estrutura das antocianinas (Fonte: Karakaya et al. (2016)).....	20
<b>Figura 7-</b> Tubos Falcon com os extratos obtidos nos 14 ensaios definidos pelo desenho experimental. ....	29
<b>Figura 8-</b> Solução da BS.....	30
<b>Figura 9-</b> Filtração do extrato de baga de sabugueiro. ....	30
<b>Figura 10-</b> Amostras de iogurte natural.....	31
<b>Figura 11-</b> Amostra 5 e 4 de iogurte com extrato de sabugueiro (da esquerda para a direita).....	32
<b>Figura 12-</b> Ensaios de iogurtes com e sem baga de sabugueiro para o T0 e T21 dias. .	33
<b>Figura 13-</b> Gráfico da curva de calibração de análise dos fenóis totais. ....	41
<b>Figura 14-</b> Gráfico da curva de calibração de análise dos flavonoides totais. ....	42
<b>Figura 15-</b> Gráfico da curva de calibração de análise por metodologia FRAP. ....	43
<b>Figura 16-</b> Gráfico da curva de calibração de análise por metodologia DPPH.....	44
<b>Figura 17-</b> Gráficos de contour e da resposta prevista pelo modelo RSM em função da concentração experimental de CFT. ....	45
<b>Figura 18-</b> Gráficos de contour e da resposta prevista pelo modelo RSM em função da concentração experimental de flavonoides totais. ....	46
<b>Figura 19-</b> Gráficos de contour e da resposta prevista pelo modelo RSM em função da concentração experimental de antocianinas. ....	47
<b>Figura 20-</b> Boxplot dos dados dos compostos fenólicos totais associados aos resultados da ANOVA 2 fatores. ....	50
<b>Figura 21-</b> Boxplot dos dados dos flavonoides totais associados aos resultados da ANOVA 2 fatores.....	52
<b>Figura 22-</b> Boxplot dos dados do DPPH associados aos resultados da ANOVA 2 fatores. ....	53
<b>Figura 23-</b> Boxplot dos dados do FRAP associados aos resultados da ANOVA 2 fatores. ....	54

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1-</b> Composição nutricional de um iogurte natural solido meio gordo (adaptado, Instituto Douro Ricardo Jorge, 2010).....	9
<b>Tabela 2-</b> Exemplos de aditivos para o iogurte com denominação “E” (Fonte: <a href="http://www.esac.pt/noronha/manuais/ROTULOS.pdf">http://www.esac.pt/noronha/manuais/ROTULOS.pdf</a> , consultado em janeiro de 2020). .....	12
<b>Tabela 3-</b> Desenho experimental. ....	28
<b>Tabela 4-</b> Parâmetros químicos dos iogurtes. ....	48
<b>Tabela 5-</b> Valores obtidos da ANOVA.....	50
<b>Tabela 6-</b> Parâmetros microbiológicos dos iogurtes.....	56
<b>Tabela 7-</b> Parâmetros microbiológicos dos iogurtes (continuação).....	57

## **Lista de abreviaturas**

% (m/v) - Percentagem em Massa/Volume

% (p/v) - Percentagem em Peso/Volume

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASAE- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BS- Baga de Sabugueiro

BS- Baga de Sabugueiro

CFT- Compostos fenólicos totais

EBS- Extrato de baga de sabugueiro

EUA- Estados Unidos da América

FAO- Organização para a Alimentação e Agricultura

FT- Flavonoides totais

g - Gramas

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LAB- Bactérias Ácido Lácteas

mg- Miligrama

mL –Mililitros

MS- Espectrometria de Massa

NP – Norma Portuguesa

OMS- Organização Mundial de Saúde

UE- União Europeia

## Resumo

O iogurte é um produto que resulta da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, conduzido por culturas de bactérias de bactérias lácticas (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Para melhorar, principalmente as características organolépticas deste produto, em alguns casos, são adicionadas outras bactérias do ácido láctico, e para alargar o tempo de vida de prateleira podem ser acrescentados produtos químicos como o sorbato de potássio. Adicionalmente, o consumidor está cada vez mais exigente e cauteloso em relação aos produtos alimentares que adquire, sendo indispensável, para ir de encontro a essas exigências, arranjar alternativas para produzir produtos de qualidade e seguros do ponto de vista microbiológicos.

Desde a antiguidade a baga de sabugueiro tem sido utilizada em medicina tradicionais e sobretudo como suplemento alimentar. Mais recentemente, alguns estudos reportam as suas propriedades biológicas entre as quais se salientam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, reguladora do metabolismo glicídico e do tónus vascular. Estas propriedades são atribuídas à sua composição, em particular aos ácidos orgânicos, ácidos fenólicos e flavonoides.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação da baga de sabugueiro (produto natural) num iogurte “sólido”, no tempo de vida de prateleira como substituto do sorbato de potássio (produto químico). Para selecionar o melhor processo de extração dos compostos fenólicos utilizou-se um desenho experimental (metodologia de superfície de resposta) fazendo variar diferentes fatores.

Os iogurtes estudados foram preparados com sorbato de potássio (0,1% m/v), extrato de sabugueiro (0,1% m/v, 0,2% m/v, 0,4% m/v) e mistura de sorbato de potássio (0,05% m/v) com extrato de baga de sabugueiro (0,1% m/v, 0,2% m/v). Foram avaliados os compostos bioativos (compostos fenólicos totais e flavonoides totais) e atividade antioxidantes (DPPH e FRAP). Estes iogurtes foram submetidos a testes de estabilidade microbiológicos sob refrigeração, foram determinados os seguintes parâmetros: pesquisa de *Salmonella spp.*, contagem total de coliformes totais e *Escherichia coli*, contagem total contagem total de bolores e leveduras, contagem total de mesófilos totais, contagem total de psicrófilos e contagem de *Stapylococcus aureus*.

Nas 6 amostras de iogurte, os valores de fenóis no tempo 0 variaram entre  $5,22 \pm 0,23$  (iogurte com 0,1% de extrato de baga de sabugueiro) e  $18,41 \pm 0,42$  mg eq.

AG/g de amostra (iogurte com 0,4% de extrato de baga de sabugueiro) aos 21 dias de armazenamento os valores obtidos foram  $3,48 \pm 0,06$  e  $22,89 \pm 0,62$  mg eq. AG/g de amostra (iogurte com 0,1% de extrato de baga de sabugueiro e iogurte com 0,4% de extrato de baga de sabugueiro, respetivamente) e na globalidade os flavonoides totais aumentaram durante o armazenamento dos iogurtes. A atividade antioxidante, avaliada pelos métodos do DPPH e do FRAP aumentou ao longo do armazenamento de antioxidantes da maioria dos iogurtes produzidos com as diferentes formulações.

No que diz respeito à estabilidade microbiológica, verificou-se que os vários parâmetros analisados foram negativos em todos os iogurtes estudados, a qualidade microbiológica é muito boa para a comercialização do produto.

Os resultados obtidos sugerem que o extrato de BS é um bom aditivo natural para a conservação do iogurte, podendo vir a substituir os aditivos químicos comumente utilizados no produto, sem alterar a viabilidade das bactérias lácticas. Adicionalmente poderá contribuir para aumentar os compostos bioativos e as propriedades biológicas do iogurte.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Iogurte; Baga de Sabugueiro

## Abstract

Yogurt is a product that results from the fermentation of pasteurized or sterilized milk, conducted by bacterial cultures of lactic acid bacteria (*Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus). To improve mainly the organoleptic characteristics of this product, in some cases other lactic acid bacteria are added, and to extend the shelf life chemicals such as potassium sorbate can be added. Additionally, the consumer is becoming more and more demanding and cautious about the food products they buy, and to meet these demands it is essential to find alternatives to produce quality products that are safe from a microbiological point of view.

Since ancient times, elderberries have been used in traditional medicine and especially as a food supplement. More recently, some studies report its biological properties among which are antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antiviral, regulator of the glycidic metabolism and vascular tone. These properties are attributed to its composition, in particular to organic acids, phenolic acids and flavonoids.

The present study aimed to evaluate the effect of incorporating elderberry (natural product) into a "solid" yogurt, on shelf life as a substitute for potassium sorbate (chemical product). To select the best extraction process for the phenolic compounds, an experimental design (response surface methodology) was used by varying different factors.

The yogurts studied were prepared with potassium sorbate (0.1% m/v), elderberry extract (0.1% m/v, 0.2% m/v, 0.4% m/v) and mixture of potassium sorbate (0.05% m/v) with elderberry extract (0.1% m/v, 0.2% m/v). Bioactive compounds (total phenolic compounds and total flavonoids) and antioxidant activity (DPPH and FRAP) were evaluated. These yogurts were submitted to microbiological stability tests under refrigeration, the following parameters were determined: Salmonella spp. research, total coliform and Escherichia coli count, total mold and yeast count, total mesophil count, total psychrophil count and Stapylococcus aureus count.

In the 6 yogurt samples, the phenols values at time 0 vary between  $5.22 \pm 0.23$  (yogurt with 0.1% elderberry extract) and  $18.41 \pm 0.42$  mg eq. AG/g (yogurt with 0.4% elderberry extract) at 21 days of storage the values obtained were  $3.48 \pm 0.06$  and  $22.89 \pm 0.62$  mg eq. AG/g (yogurt with 0.1% elderberry extract and yogurt with 0.4% elderberry extract, respectively) and overall total flavonoids increased during storage of

yogurts. The antioxidant activity, evaluated by the DPPH and FRAP methods increased throughout the antioxidant storage of most of the yogurts produced with the different formulations.

Regarding microbiological stability, it was found that the various parameters analyzed were negative in all yogurts studied, the microbiological quality is very good for the marketing of the product.

The results obtained suggest that BS extract is a good natural additive for the preservation of yogurt and may replace the chemical additives commonly used in the product, without altering the viability of lactic acid bacteria. Additionally, it may contribute to increase the bioactive compounds and the biological properties of yogurt.

**Keywords:** Antioxidant; Yogurt; Elderberry.

## Introdução geral

A indústria alimentar tem evoluído ao longo do tempo, indo ao encontro das necessidades e exigências dos consumidores. Nos primórdios da humanidade a indústria era escassa ou praticamente inexistente, e dedicava-se principalmente à produção de alimentos para a consumo próprio, isto é, agricultura de sobrevivência. Atualmente, com as alterações que se tem verificado nos hábitos alimentares a produção de alimentos tem dado particular relevância ao desenvolvimento de produtos de qualidade, ricos em nutrientes e que apresentem benefícios para a saúde (Vulić et al., 2019). Ou seja, ajustar o conceito de usar os alimentos na promoção de bem-estar e saúde (Matsubara, 2001).

Neste sentido baseados na reutilização, reciclagem e recuperação de recursos, pretende-se que as bagas de sabugueiro, sejam exploradas de forma a maximizar os lucros e ao mesmo tempo reduzir a quantidade de resíduos contribuindo para a sustentabilidade ambiental, o que se enquadra totalmente na economia circular, de acordo com o Regulamento Europeu (CE) 1999/31 e 2008/98.

Os antioxidantes representam nos dias de hoje uma ferramenta muito importante associada à prevenção de doenças (Apak et al. 2013). Todos nós necessitamos de antioxidantes, desde as crianças, nas quais os danos causados por radicais livres são mais perniciosos do que na fase adulta, até aos idosos, que são muito suscetíveis a sofrer de danos oxidativos.

Devido à sua segurança e potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos, os antioxidantes e corantes naturais suscitam interesse científico, não só pelos benefícios que proporcionam ao organismo, como também por constituírem uma possível alternativa aos corantes sintéticos que estão associados a diversas complicações de saúde e são foco de preocupação por parte dos consumidores (Martins et al., 2016). Neste contexto, impõe-se a implementação de estratégias de produção que utilizem componentes naturais, preferencialmente com a dupla função de prevenir oxidações e atuar como conservantes.

Os antioxidantes presentes na dieta alimentar poderão também atuar de forma complementar aos sistemas antioxidantes desenvolvidos pelo organismo de forma a exercer um efeito sinérgico, e assim prevenir o stress oxidativo mais naturalmente (Carocho *et al.*, 2013; Pisoschi *et al.*, 2015).

A exigência dos consumidores e a sua preocupação crescente em conseguir uma dieta equilibrada faz com que os alimentos funcionais sejam cada vez mais solicitados

(Bruschi *et al.*, 2015; Quílez *et al.*, 2006). O potencial conservante e bioativo proporcionado pelo extrato de sabugueiro é certamente uma mais-valia para considerar esta matriz natural como uma fonte de compostos a incluir em alimentos, particularmente no iogurte.

## **Objetivos**

### **Objetivo geral**

- ✓ Avaliar o efeito da incorporação da baga de sabugueiro na forma de extrato bruto como aditivo natural para melhorar as características do iogurte.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Otimizar as condições de extração de compostos fenólicos da baga de sabugueiro usando um desenho experimental Box-Wilson e aplicando o método de resposta por superfície.
- ✓ Elaborar iogurte com adição de sorbato de potássio (aditivo químico utilizado no produto convencional) como controle;
- ✓ Avaliar e comparar o tempo de vida de prateleira dos iogurtes incorporados com extrato da baga de sabugueiro e do iogurte convencional com sorbato de potássio;
- ✓ Caracterizar os iogurtes através da atividade antioxidante e compostos bioativos.



# CAPÍTULO 1

## **Introdução**

- 1.1 Iogurte
- 1.2 Aditivos alimentares
- 1.3 Baga de sabugueiro
- 1.4 Compostos fenólicos
- 1.5 Flavonoides
- 1.6 Antocianinas
- 1.7 Propriedade antioxidante
- 1.8 Avaliação da qualidade microbiológica

## **1.1 Iogurte**

O iogurte é considerado um dos principais produtos lácteos (Ramírez-Sucre *et al.*, 2013; Miele *et al.*, 2017). O seu consumo está relacionado, com as suas características sensoriais e com a imagem de alimento saudável e nutritivo (Teixeira *et al.*, 2000). De facto, são muitos os benefícios associados ao consumo deste produto lácteo, a salientar: estimula a ação das proteínas e enzimas digestivas; promove a absorção de cálcio, fósforo e ferro; é fonte de galactose e é importante na síntese dos tecidos nervosos em crianças. Adicionalmente, também pode ser considerada uma forma indireta de consumir leite (Ferreira *et al.*, 2001).

O iogurte é uma excelente fonte de proteína, cálcio, fósforo, riboflavina, tiamina, vitamina B12, magnésio e zinco (Das *et al.*, 2019). Durante o processo de fermentação ocorre hidrólise parcial das proteínas, gorduras e lactose, facilitando a digestão e aumentando a biodisponibilidade do alimento para o consumidor, característica benéfica inclusive para os indivíduos com menor tolerância à lactose (Ramos *et al.*, 2019)

A nível mundial, segundo os dados da “Food and Agriculture Organization” (FAO), em 2003 a produção do iogurte era de aproximadamente cerca 250 mil toneladas/ano tendo aumentado para cerca de 280 mil toneladas em 2013, os picos de produção observaram-se nos anos 2006 e 2007 (FAO, 2015). O Dairy Index da Tetra Pak (2014) estima que até 2024 o consumo deste produto lácteo no mundo pode aumentar 36%.

Em Portugal, o iogurte ocupa o segundo lugar em termos de produtos lácteos consumidos. No período de 2008 a 2012 o consumo diário per capita correspondeu a 17,6% (Instituto Nacional de Estatística, 2017).

Em 47,0% dos agregados familiares o consumo médio semanal, variava entre quatro e doze iogurtes (Marketeer, 2020).

### **1.1.1 Produção do iogurte**

O processo geral de fabrico do iogurte consiste no pré-tratamento térmico do leite (já homogeneizado quanto ao teor de gordura) destinado a diminuir a microbiota e a desnaturar parcialmente as proteínas do soro. A esta etapa segue-se a inoculação com as bactérias do ácido láctico (LAB) e incubação à temperatura adequada ao seu crescimento.

Estas bactérias vão converter os açúcares do leite em ácido láctico com o consequente abaixamento dos valores de pH. Nestas condições, ocorre a coagulação da caseína formando uma estrutura reticular com os lípidos, minerais e algumas das proteínas do soro desnaturadas, com a consequente formação de um gel com uma consistência firme ou viscosa (iogurtes sólidos ou batidos) (Tamime, 2006).

Nos iogurtes líquidos, para transformar o coágulo em partículas efetua-se uma homogeneização. Na etapa seguinte após adição dos estabilizantes e aditivos adequados (açúcar, sumo ou pedaços de frutas, aromas) o produto é embalado. Nos iogurtes concentrados ao efetuar o dessoramento ocorre perda de água e nutrientes na forma de soro (Tamime, 2006).

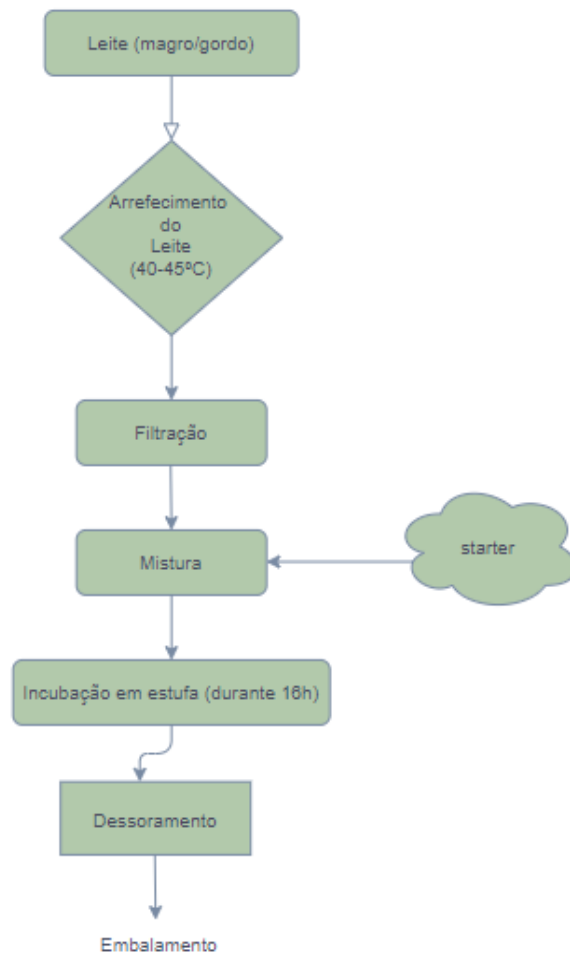
As bactérias lácticas que levam a cabo a fermentação, são divididas em dois grupos: homofermentativas degradam os açúcares transformando-os principalmente em ácido láctico que é responsável pela coagulação das caseínas do leite; heterofermentativas metabolizam os açúcares com produção de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido pirúvico, álcoois e gases (Tronco, 1997).

Para garantir as características desejadas (acidez e aroma) do produto final, durante a fermentação a multiplicação dos dois grupos de bactérias deve ser equilibrada.

O pH do iogurte pode variar entre 3,6 e 4,2, no entanto, em alguns casos podem observar-se valores de pH final de 4,5. A acidez torna estes produtos relativamente estáveis por inibir o crescimento de microrganismos de deterioração e patogénicos, particularmente bactérias Gram positivo (Rodas, 2001).

Apesar dos valores reduzidos de pH, o iogurte deve ser conservado em condições de refrigeração (4°C) para garantir a preservação dos nutrientes, das características físico-químicas e organoléticas, bem como a viabilidade e vitalidade das bactérias lácticas probióticas presentes no mesmo (OMS, 2011; Albuquerque *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2013).

Na Figura 1 está representado, de forma sumária, o diagrama de fabrico do iogurte.



**Figura 1-** Fluxograma do processo de produção do iogurte (Fonte: UFPR, 2006)

Segundo Robinson *et al.* (2000), os microrganismos das culturas iniciadoras (*starter*) desempenham um papel importante na produção do iogurte, nomeadamente no desenvolvimento da acidez e do sabor. De facto, a pureza das culturas *starter* utilizadas na produção deste produto lácteo é importante por permitir um maior controlo do processo, por exemplo, controlando rigorosamente a temperatura de incubação pode prever-se a velocidade de formação de ácido e o tempo de processamento. Deste modo é possível efetuar o arrefecimento do iogurte logo que atinja o nível desejado de acidez, o que se irá traduzir na melhoria da qualidade final do produto (Robinson *et al.*, 2000).

O iogurte pode ser natural, açucarado, aromatizado ou com pedaços de fruta. O iogurte natural é constituído apenas por leite e culturas microbianas, ao açucarado adicionam-se sacarose ou outro tipo de açúcar, edulcorantes e emulsionantes. Nos iogurtes aromatizados incorporam-se aromas ou outros aditivos alimentares e aos iogurtes com pedaços são adicionados pedaços de fruta (aditivos naturais), geralmente na forma

dum xarope com 50% de açúcar. A mistura de fruta não deve ultrapassar 18% do total do produto (Bylund, 1995).

As frutas são adicionadas preferencialmente aos iogurtes batidos, sendo que, em muitos destes produtos para garantir a qualidade e estabilidade é essencial controlar atributos como: aroma, sabor, cor, doçura e pH (Chandan, 2006).

A popularidade do iogurte deve-se, em grande parte, aos sabores e aromas a fruta, isto porque, os consumidores reconhecem as frutas como alimentos saudáveis. Os iogurtes mais vendidos são os que tem um dos seguintes sabores: morango, baunilha, pêssego, framboesa, morango-banana, mistura de frutas, lima, limão, mirtilo, cerejas e amoras. Normalmente, estes produtos apresentam uma grande versatilidade de cores, texturas, sabores e tamanho dos pedaços de fruta (Chandan, 2006).

Convém salientar que, os consumidores que não apreciavam leites fermentados na sua forma natural aceitam melhor os iogurtes com frutas. As frutas podem ser adicionadas frescas, congeladas, em conserva, liofilizadas, em pó, sumos, polpa ou purê (Zicker, 2011). Outro tipo de iogurte existente no mercado é o tipo “sundae” que se caracteriza por apresentar xarope, geleia de fruta, ou fruta em pedaços, no fundo da embalagem.

Diversos polissacarídeos e seus derivados (dos quais se destacam pectinas, amidos e carragenatos) são usualmente utilizados na indústria alimentar devido às características reológicas e textura que conferem ao produto final.

Estes compostos, geralmente, são adicionados aos preparados de frutas a utilizar nas formulações do iogurte, no entanto a crescente tendência dos consumidores por produtos naturais e *clean label* despoletaram a necessidade de investigar novos recursos para reduzir ou eliminar a utilização de polissacarídeos bem como de outros aditivos, tais como aromas e conservantes artificiais. Uma solução encontrada para substituir total ou parcialmente os preparados de fruta passou pela funcionalização da fruta, recorrendo a auxiliares tecnológicos, bem como à utilização de extratos de produtos naturais (Simões, 2015).

### **1.1.2 Composição nutricional e química**

Tal como foi referido anteriormente, o iogurte é um produto biológico altamente recomendado devido as suas propriedades probióticas, nutricionais e sensoriais. De acordo com Brandão (1995), da composição físico-química do iogurte fazem parte: lipídios, 1,5%; lactose 3-4,5%; estabilizantes 0,3-0,5%, sólidos totais 12-16% e vitaminas

do complexo B. Ainda segundo este investigador, os estabilizantes mais frequentemente utilizados são gelatina, pectina e ágar-ágar. Também, para melhorar as características sensoriais e aumentar o valor nutricional do iogurte, nomeadamente o teor em proteínas, alguns investigadores recomendam a adição de leite em pó ou concentrados proteicos. Convém salientar que, os constituintes do iogurte fazem com que este produto seja facilmente assimilável por indivíduos com intolerância à lactose, lactantes, gestantes e pessoas idosas, particularmente quando necessitem de reposição de cálcio. A composição nutricional do iogurte está sumariada na Tabela 1.

O valor nutritivo do iogurte depende de vários fatores, entre os quais se salientam: a matéria-prima utilizada, ingredientes adicionados e o processo de fabrico (Early, 2000).

**Tabela 1-** Composição nutricional de um iogurte natural solido meio gordo (adaptado, Instituto Douro Ricardo Jorge, 2010).

Energia	
Componentes	por 100 g*
Energia, kcal	54,0
Energia, Kj	226,0
Macroconstituintes	
Componentes	por 100 g*
Água, g	87,9
Proteína, g	4,2
Gordura total, g	1,8
Total de Hidratos de Carbono disponíveis, g	5,0
Total de Hidratos de Carbono expresso em monossacáridos, g	5,3
Mono+dissacáridos, g	5,0
Ácidos orgânicos, g	0,4
Ácidos gordos	
Componentes	por 100 g*
Ácidos gordos saturados, g	1,0
Ácidos gordos monoinsaturados, g	0,4
Ácidos gordos polinsaturados, g	0,1
Ácidos gordos trans, g	0,1
Ácido linoleico, g	0,1
Colesterol	

Componentes	por 100 g*
Colesterol, mg	6
<b>Vitaminas</b>	
Componentes	por 100 g*
Vitamina A total (equivalentes de retinol), µg	30
Caroteno, mg	17
Vitamina D, µg	0
a-tocoferol, mg	0,03
Tiamina, mg	0,03
Riboflavina, mg	0,24
Equivalentes de niacina, mg	1,1
Niacina, mg	0,2
Triptofano/60, mg	0,9
Vitamina B6, mg	0,034
Folatos, µg	1,7
<b>Minerais</b>	
Componentes	por 100 g*
Cinza, g	0,75
Sódio (Na), mg	62
Potássio (K), mg	183
Cálcio (Ca), mg	118
Fósforo (P), mg	108
Magnésio (Mg), mg	12
Ferro (Fe), mg	0,2
Zinco (Zn), mg	0,5

### 1.1.3 Qualidade Do Iogurte

Na avaliação da qualidade do iogurte deve atender-se aos seguintes aspetos: segurança alimentar, características físico-químicas e sensoriais.

O estudo da qualidade microbiológica envolve a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, contagem de bolores e leveduras, teste de produção de acetaldeído e avaliação de outros aspetos legais (conformidade quanto ao tipo e testes de validade comercial e de segurança) (Souza, 1991). Na avaliação química, os parâmetros a analisar incluem: acidez titulável, pH, determinação da composição nutricional e da validade comercial. Arcuri *et*

*al.*, (2006) referiram que o pH e a acidez do produto final condicionam o seu aroma e sabor, de facto, um elevado teor de acetaldeído influencia diretamente as características organoléticas do iogurte. Early (2000) reportou que para obter um produto final de qualidade é necessário controlar rigorosamente as características físicas e químicas da matéria-prima, os ingredientes adicionados, o tratamento térmico aplicado, a emulsificação ou homogeneização e a preparação da cultura “*starter*”.

Segundo Schmidt *et al.*, (2012), a qualidade sensorial de um iogurte pode ser avaliada utilizando métodos sensoriais descritivos os quais, fornecem informações sobre a sua aparência, aroma, sabor e consistência. Com base nesta análise, Lima *et al.*, (2006) referem que a firmeza, sem que haja separação de soro, é essencial para obter produtos de alta qualidade. Convém salientar, que a avaliação das propriedades sensoriais também não deve ser descuidada (Galdino *et al.*, 2010; Giese *et al.*, 2010; Loures *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2011; Mesquita *et al.*, 2012; Quintino, 2012; Schmidt *et al.*, 2012).

#### **1.1.4 Microbiota do iogurte**

Tal como reportado na literatura, a microbiota do iogurte desempenha inúmeras funções importantes, destacando-se a capacidade de restabelecer a flora intestinal, aumentar a digestibilidade comparativamente com o leite, devido à maior disponibilidade da lactase como resultado da atividade de probióticos (“microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”). Esta enzima degrada a lactose (Sá *et al.*, 2007) tornando o produto mais digerível por pessoas intolerantes a este açúcar. De facto, 50% do teor inicial de lactose é hidrolisada pelas bactérias lácticas que conduzem a fermentação.

Adicionalmente, durante o metabolismo do organismo humano, devido, principalmente ao pH ácido do estômago, algumas das bactérias lácticas presentes no iogurte sofrem “lise”, com libertação da lactase, que também contribui para a degradação da lactose presente no iogurte (Brandão, 1995). Este investigador reporta ainda, que a microbiota deste alimento, particularmente *Lactobacillus bulgaricus* evidencia a capacidade para produzir substâncias anticancerígenas. Segundo Rocha *et al.*, (2008) os efeitos anti-colesterolêmicos e antimicrobianos são outros dos benefícios relacionados com o consumo deste produto lácteo.

## 1.2 Aditivos Alimentares

O Codex Alimentarius, (1995) e a FAO, (2010) definem aditivo alimentar como uma substância cujo uso represente, direta ou indiretamente, uma melhoria das características de qualquer alimento, ou a sua manutenção ao longo do tempo, sem representar qualquer perigo para a saúde do consumidor, podendo ser utilizado na produção, transformação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de alimentos.

O Regulamento (CE) n.º 1333/2008, faz referência ao controlo e à regulamentação relativos aos aditivos alimentares, bem como a toda a legislação específica, limites máximos e respetiva utilização de aditivos.

Os aditivos utilizados na indústria alimentar podem ser de origem natural ou sintética (Lidon *et al.*, 2008; Belitz, *et al.*, 2009).

Atualmente, estão descritos aproximadamente 2.500 aditivos alimentares que podem ser utilizados na indústria alimentar. Na Tabela 2 apresentam-se alguns exemplos de aditivos, função e códigos presentes nos rótulos dos alimentos.

**Tabela 2-** Exemplos de aditivos para o iogurte com denominação “E” (Fonte: <http://www.esac.pt/noronha/manuais/ROTULOS.pdf>, consultado em janeiro de 2020).

Família	Função	Código
Corantes	Corar os alimentos	E 100 - E 180
Conservantes	Prolongar a durabilidade dos alimentos	E 200 - E 252 - E 280 - E285
Antioxidantes	Proteger da deterioração provocada pelo oxigénio do ar	E 300 - E 321
Emulsionantes	Ligar os líquidos não miscíveis como a água e o óleo	E 400 - E 495 - E 322
Gelificantes	Dar textura através da formação de um gel	E 400 - E 495 - E 322
Espessantes	Aumentar a viscosidade dos géneros alimentícios	E 400 - E 495 - E 322

	para, por exemplo, dar uma consistência aveludada	
Estabilizadores	Evitar a separação ou o depósito das substâncias	E 400 - E 495 - E 322
Intensificadores de sabor	Reforçar um gosto existente	E 620 - E 640
Acidificantes	Aumentar a acidez, seja para modificar o gosto, seja para melhorar a conservação	E 260 - E 297
Reguladores de acidez	Regular a acidez dos alimentos	E 322 - E 385
Antiaglomerantes	Evitar que os alimentos formem grumos	E 500 - E 585
Edulcorantes	Dar gosto açucarado, mas de baixo valor energético	E 420 - E 421 - E 950 - E 967
Agentes de revestimento	Dar um aspeto brilhante ou formar uma película protetora	E 901 - E 904 - E 912 - E 914

### 1.2.1 Aditivos Sintéticos

O desenvolvimento da ciência e tecnologia dos alimentos levaram à utilização de muitas substâncias novas com diversas funções tecnológicas, os aditivos (ASAE, 2013). Estas substâncias atualmente estão presentes em praticamente todos os alimentos preparados/transformados. Por se tratar de substâncias químicas intencionalmente adicionadas aos alimentos, é fundamental conhecer as suas propriedades e características de forma a garantir o uso adequado e a segurança para o consumidor (Aun *et al.*, 2011).

Os aditivos alimentares podem ser divididos em função da sua atividade como: conservantes, aditivos nutricionais, corantes, agentes aromatizantes, agentes texturizantes e agentes diversos.

Os conservantes subdividem-se em antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti-escurecimento. Os corantes englobam os compostos contendo azoto, os derivados de quinoftalona, os compostos de triarilmetano, os xantenos e os pigmentos policíclicos (Carocho *et al.*, 2015; Barreiro *et al.*, 2014).

Segundo a ANVISA (2009), o uso de aditivos em alimentos deve ser controlado devido aos riscos que representam para a saúde dos consumidores, particularmente para as pessoas alérgicas a determinado aditivo alimentar. Por exemplo, algumas substâncias podem causar problemas graves como, cancro, desenvolvimento de alergias, hiperatividade, entre outros.

Na formulação tradicional de iogurtes, os aditivos eram utilizados como espessantes, aromatizantes, acidulantes, conservantes e corantes. Os corantes e os conservantes representam o maior risco, pois, quando utilizados em excesso, podem causar alergias e disfunções digestivas e metabólicas. Deste modo, é imperioso estar atento aos possíveis riscos toxicológicos destas substâncias resultantes principalmente da sua ingestão frequente (Peres *et al.*, 2009).

Segundo a Legislação Portuguesa, o sorbato de potássio (aditivo sintético) está autorizado na produção de iogurte. Este composto (Figura 2) é amplamente usado em produtos alimentares por ser um conservante fungicida e bactericida, inibidor de crescimento de bolores e leveduras. Utiliza-se o sorbato de potássio porque é mais solúvel em água do que o ácido sórbico, que existe de forma natural em alguns frutos.

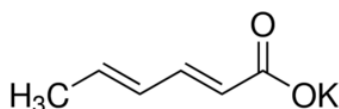


Figura 2- Estrutura molecular do sorbato de potássio.

### 1.2.2 Aditivos Naturais

A palavra “natural” quando aplicada aos géneros alimentícios pode ser definida como “produzido pela natureza” o que não está totalmente correto, uma vez que muitos odores/aromas agradáveis e característicos do alimento resultam do processo de fabrico do produto alimentar pelo ser humano (Baines, 2010).

Khan *et al.* (2010) reportaram que um produto natural é definido como "produto que é derivado de fontes vegetais, animais ou microrganismos, principalmente por meio

de processamento físico, às vezes facilitado por reações químicas simples, como a acidificação, alcalinização, troca iônica, hidrólise e formação de sais, bem como da fermentação conduzida por microrganismos."

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1334/2008 os aromas são definidos como "produtos não destinados a serem consumidos como tal e que são adicionados aos alimentos, a fim de lhes transmitir ou modificar o odor e/ou sabor".

Os aditivos artificiais têm sido preteridos em relação aos aditivos naturais, isto porque os aditivos naturais além de contribuírem para a conservação dos alimentos conferem-lhes diferentes cores, sabores, odores, ou texturas, que vão de encontro às expectativas dos consumidores (Carocho *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2016). Os aditivos de origem natural são também preferidos devido aos diversos problemas de saúde associados aos aditivos de origem artificial (Carocho *et al.*, 2015).

Apesar dos consumidores terem preferência pelos aditivos naturais, apenas existe legislação na União Europeia e nos EUA para os aromatizantes (Carocho *et al.*, 2015).

Os aditivos naturais são obtidos a partir matérias-primas de composição variável, consequentemente a quantidade e a qualidade de substâncias ativas, bem como o conteúdo dos vários outros compostos presentes dependem da variedade do substrato que lhes deu origem, das condições climáticas, entre muitos outros fatores.

Conforme reportado por Pokorný (2001), os aditivos naturais mais amplamente utilizados não são puramente naturais, tem apenas uma natureza idêntica. Isto significa, que a sua estrutura é a mesma que a das substâncias naturais, mas são obtidos por síntese química e fornecidos num estado relativamente puro, como é o caso dos tocoferóis sintéticos, e dos ácidos ascórbico e cítrico.

Alguns exemplos de antioxidantes naturais são os compostos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides e tocoferóis (Carocho *et al.*, 2015).

### **1.3. Baga do sabugueiro**

O sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) é uma árvore/arbusto nativo da Europa, Norte de África e Ásia Ocidental e Central. Pertence à família das Adoxáceas, sendo também conhecida pelo seu nome comum como canineiro, sabugo ou galacrista. O arbusto/árvore é muito ramificado, apresentando uma copa globosa que pode atingir 7 metros de altura. Prefere solos com certa humidade, nível freático elevado, nomeadamente nas margens

dos cursos de água e cresce em todo o território português, sendo também cultivado como planta ornamental (Cunha, 2011).

É uma planta hermafrodita (polinização realizada pelos insetos e pelo vento), com flores brancas pequenas reunidas em grandes corimbos, muito atrativas para os insetos). A floração ocorre durante o início do verão, posteriormente forma-se o fruto, cuja maturação ocorre desde o final do verão ao início do outono, apresentando a forma de bagas pretas brilhantes. Este fruto maduro, é o único produzido pelas cerca de 25 espécies do gênero *Sambucus*, que é comestível (Divis *et al.*, 2015).

As bagas desta planta são um importante alimento para aves, nomeadamente para as toutinegras e melros. Em vários países europeus, as flores mais velhas e as bagas servem como fonte alternativa de ingredientes na indústria de alimentos, por exemplo, para produzir tortas, geleias, gelados, iogurtes e diferentes bebidas, como vinho, chá, licor e sumos (Vlachojannis, *et al.*, 2014; Divis, *et al.*, 2015; Mikulic-Petkovsek, *et al.*, 2015).

### **1.3.1 Toxicidade e efeitos benéficos do sabugueiro**

Na medicina tradicional, o sabugueiro era uma das plantas medicinais mais utilizadas, nomeadamente para baixar o ácido úrico, para reduzir a ocorrência de cálculos renais e eliminar toxinas em geral, sendo ainda considerado um excelente depurador do sangue. Atua em casos de febre de origem desconhecida, estimula a formação de urina e suor, bem como a produção de leite materno (por conter óleos essenciais). Era também utilizado no combate a resfriados, rouquidão, tosse, espirros, catarros do peito e brônquios, dores de dentes, ouvidos e da cabeça, nevralgias, e inflamação da laringe e garganta. É uma das plantas medicinais mais ativas contra influenza vírus. A flor e a baga de sabugueiro foram propostas como remédio para a diabetes (Cerdeira, 2010; Ricardo da Silva, 2017). Estudos recentes suportaram os potenciais efeitos positivos na saúde humana. No entanto, apesar de todos os benefícios reportados, as folhas, a casca fresca e o fruto verde desta planta, contem lectinas e sambunigrina. Este último composto é um glicosídeo cianogénico que é hidrolisado no trato gastrointestinal com produção de cianeto, substância ligeiramente tóxica. Estas substâncias podem provocar náuseas, vómitos e efeitos colaterais mais graves, incluindo dormência e letargia (Ulbricht *et al.*, 2014).

Segundo Vlachojannis *et al.* (2010) a inalação ou contato com flores de sabugueiro e com sumo de flores em fases de maturação mais avançada pode provocar

rinoconjuntivite e sintomas asmático. Neste contexto, as bagas e os frutos maduros (comestíveis) devem ser ingeridos preferencialmente secos e com moderação.

Apesar da sua ligeira toxicidade, que deve ser avaliada antes das bagas serem utilizadas, estas têm vindo a ser usadas, concentrações baixas, em concentrados, sumos e infusões. Já lhe foram atribuídas ações benéficas em diferentes doenças, particularmente em constipações e outras infeções do trato respiratório superior (por exemplo, sinusite bacteriana e bronquite), exercem também efeitos diuréticos, diaforéticos e analgésicos (Duymuş *et al.*, 2014; Scopeli *et al.*, 2007; Ulbricht *et al.*, 2014; Vlachoianis *et al.*, 2010).

São-lhe também atribuídas atividade anti-inflamatória e imuno-estimulante, que poderão potenciar efeitos preventivos na propagação de células tumorais (Dudonné, 2015; Duymuş *et al.*, 2014; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2014; Vlachoianis *et al.*, 2015; Vlachoianis *et al.*, 2010). No entanto Smeriglio *et al.*, (2006) reportam que não existem dados clínicos suficientes para suportar algumas destas atividades.

O perfil de componentes bioativos e as propriedades biológicas dos extratos da baga de sabugueiro estão associadas ao seu perfil em compostos fenólicos, que depende do tipo e genótipo do fruto, das condições de crescimento da planta, da localização geográfica, da tecnologia de processamento aplicada e do estado de maturação (KossMikołajczyk *et al.*, 2016; Diviš *et al.*, 2015).

### **1.3.2 Sabugueiro Como Aditivo Natural**

O sabugueiro contém pigmentos orgânicos, taninos, aminoácidos, carotenóides e flavonóides, incluindo a quercitina, antocianinas, ácido vibúrnico, vitaminas A e B e, uma grande quantidade de vitamina C. Vários estudos demonstram que estas antocianinas melhoram a função imunológica dos indivíduos (Cerqueira, 2010).

O poder corante das bagas de sabugueiro já foi objeto de estudo (Senica *et al.*, 2016; Vlachoianis, Zimmermann, and ChrubasikHausmann, 2015; Mladenka *et al.*, 2016; Lee and Finn, 2007; Buchweitz *et al.*, 2013; Nowak *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2011; Ulbricht *et al.*, 2014; Zaffino *et al.*, 2016), tendo os vários investigadores constatado o seu potencial para a indústria a este facto também está associado baixo custo de produção.

O “bagaço” que resta após a extração do sumo ainda contém uma quantidade significativa dos compostos bioativos, podendo também ser utilizado para fins industriais. De referir, que os produtos à base da baga de sabugueiro devem ser caracterizados antes

de serem utilizadas, dando especial atenção ao teor em antocianinas (Vlachojannis *et al.*, 2010). Com isto pretende-se obter condições de produção padronizadas, em especial do sumo, que permitam ultrapassar as limitações impostas pela sazonalidade na produção destas bagas (Nowak *et al.*, 2016).

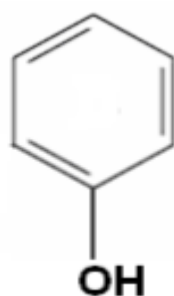
As antocianinas são os compostos predominante nas bagas de sabugueiro (Nowak *et al.*, 2016) e podem constituir uma boa opção para a coloração de alimentos com um pH baixo (Buchweitz *et al.*, 2013), por apresentarem maior estabilidade em condições ácidas, como bebidas, conservas, gelados, compotas e geleias, molhos e produtos de confeitaria (Szalóki-Dorkó *et al.*, 2016). No entanto, é de salientar que, comparativamente a outros sumos como o de arando ou de romã, o sumo de baga de sabugueiro é o menos ácido (Nowak *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2007), o que alarga a gama de produtos nos quais pode ser aplicado.

#### 1.4. Compostos fenólicos

Um composto fenólico é uma substância caracterizada pela presença de pelo menos um grupo hidroxilo diretamente ligado a um anel aromático. O composto mais simples é o fenol (Figura 3), faz parte do metabolismo animal, está amplamente distribuído no reino vegetal e nos microrganismos, (Bravo, 1998).

Segundo Alberti (2014), a composição dos compostos fenólicos nas frutas depende da variedade e do seu estado de maturação. Estes compostos são mais abundantes nos citrinos, como o limão e a laranja, e em frutas, como a maçã, pêra, mamão, uva e cereja (Ferrandin, 2014).

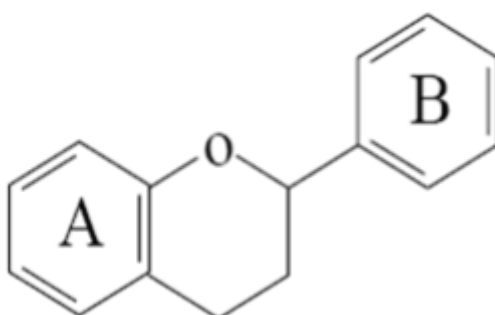
A utilização de compostos fenólicos, mais especificamente de ácidos fenólicos, como antioxidantes na conservação de alimentos pode aumentar a vida útil do produto entre 15 a 200% (Soares, 2002). Estes compostos tem merecido grande atenção nos últimos anos por serem capazes de inibir a peroxidação lipídica (Sousa *et al.*, 2007).



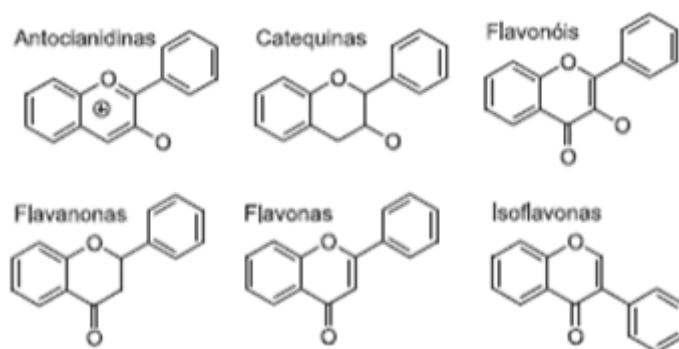
**Figura 3-** Estrutura química básica dos compostos fenólicos. Fonte: (Alberti, 2014).

## 1.5 Flavonoides

Os flavonoides são pigmentos naturais presentes no reino vegetal (Dreosti, 2000). A sua estrutura é caracterizada pela existência de uma forma de esqueleto C6-C3-C6 com 15 átomos de carbono e por duas partes da molécula com 6 átomos de carbono são anéis aromáticos (Março *et al.*, 2008; Volp *et al.*, 2008). A estrutura básica e a estrutura química dos flavonoides apresentam-se na figura 4 e na figura 5.



**Figura 4-** Estrutura básica dos flavonoides (Fonte: Março *et al.* (2008))

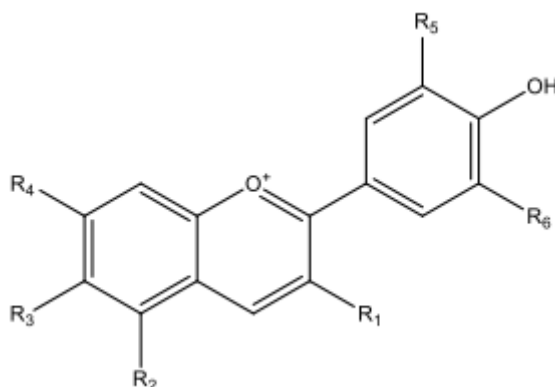


**Figura 5-** Estrutura química dos principais flavonoides (Fonte: Março *et al.* (2008)).

Os flavonoides são responsáveis pela cor das folhas e das flores, no entanto também podem estar presentes noutras partes da planta. Estes compostos absorvem a radiação eletromagnética na faixa ultravioleta visível (UV) e desempenham um papel relevante na proteção das plantas da luz solar e da radiação ultravioleta (Bobbio, 2001).

## 1.6 Antocianinas

As antocianinas (Figura 6) são os glucósidos hidrossolúveis das antocianidinas, são solúveis em água e estão largamente distribuídas na natureza, em especial em grãos, flores e frutos como morango, baga de sabugueiro, mirtilo, uva vermelha, framboesa, cereja e groselha (Karakaya *et al.* 2016; Assous, Abdel-Hady *et al.* 2014).



**Figura 6-** Estrutura das antocianinas (Fonte: Karakaya et al. (2016)).

As antocianinas são flavonoides ubíquos na natureza, são responsáveis pela maior parte do azul, roxo e todos os tons de vermelho nas flores e nos frutos (Abe *et al.*, 2007).

As antocianinas possuem uma estrutura química adequada para exercer efeitos antioxidantes e para fornecer elétrons ou átomos de hidrogênio dos radicais livres, desempenhando um papel importante na prevenção ou atraso na ocorrência de várias doenças (Volp *et al.*, 2008). A sua estrutura é caracterizada pela existência de um esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. No entanto, ao contrário de outros flavonoides, as antocianinas absorvem na região da luz visível do espectro, o que pode explicar a diversidade de cores que conferem (Março *et al.*, 2008).

A aplicação de pigmentos naturais e a sua importância como antioxidante em alimentos são objeto de interesse para a indústria e para os consumidores. Estudos recentes relacionaram a ingestão de frutas e vegetais com propriedades antioxidantes à redução do risco de desenvolvimento de certas doenças crônico-degenerativas. O uso destes pigmentos em alimentos agrega valor à imagem final do produto (Volp *et al.*, 2008).

Embora amplamente difundido na natureza, existem poucas fontes de antocianinas comercialmente disponíveis. Altas temperaturas, a presença de açúcares e de ácido

ascórbico pode causar descoloração das antocianinas. Também o pH, a luz são fatores importantes na alteração da cor destes compostos (Bobbio, 2001).

## **1.7 Propriedade antioxidante**

De acordo com Becker *et al.* (2004), um antioxidante em alimentos é uma substância que em pequena quantidade pode evitar ou retardar a oxidação de substâncias levemente oxidáveis, por exemplo, a gordura. Nas últimas décadas, os antioxidantes têm despertado grande interesse nos profissionais da saúde, pois ajudam o organismo a proteger-se dos efeitos nocivos causados por espécies reativas de oxigênio e azoto associadas a doenças degenerativas (Sánchez-Moreno, 2002).

De facto, a falta de terapias eficazes para a maioria das doenças crônicas faz com que o uso de antioxidantes na proteção contra essas doenças seja cada vez mais importante. Tais efeitos resultam do potencial de oxidação redução de determinados compostos, da capacidade de competição por sítios ativos e recetores nas múltiplas estruturas celular, da capacidade para modular a expressão de genes codificantes de proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (DNA, membranas) (Bastos *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2016).

Existem, atualmente, antioxidantes de síntese e antioxidantes naturais. Os antioxidantes naturais são aqueles extraídos de tecidos de plantas e de animais, ou que se formam durante o processamento de produtos alimentares de origem vegetal ou animal. Estes compostos favorecem a prevenção de doenças encontram-se presentes em quase todas as plantas, tecidos animais e microrganismos, sendo na sua maioria compostos fenólicos, sobretudo, flavonoides, tocoferóis e ácidos fenólicos, (Pereira, 2010).

Existe uma grande variedade de antioxidantes sintéticos, dentre eles os mais utilizados salienta-se o butil hidroxitolueno (BHT) e o butil hidroxianisol (BHA); estes compostos são adicionados aos alimentos para prolongar a vida de prateleira (Carocho *et al.*, 2013). No entanto, a utilização destes compostos vindo a ser restringida, devido a estudos que sugerem a existência de uma relação entre a sua utilização e a ocorrência de intoxicações e cancro (Oliveira *et al.*, 2014).

## **1.8 Avaliação da qualidade microbiológica**

O estudo da microbiota de um produto é essencial para avaliar; as condições sanitárias dos alimentos preparados; o risco dos alimentos para a saúde dos consumidores e para determinar o tempo de vida de prateleira. Estas análises também são importantes para verificar se os padrões e as regulamentações microbiológicas de alimentos, nacionais ou internacionais, são atendidos (Franco *et al.*, 1996).

Na literatura são reportados muitos métodos para a detecção quantitativa e qualitativa de microrganismos em alimentos. No entanto, devem usar-se métodos aprovados pelas agências reguladoras, que podem ser métodos padrão ou recomendados. Atualmente esses métodos são divididos em métodos convencionais e métodos rápidos (Franco *et al.*, 1996; Ray, 1996).

O procedimento usado depende do tipo de alimento que está a ser analisado e da finalidade específica da análise. A escolha também pode depender do tipo de microrganismo pesquisado/ quantificado no alimento suspeito de causar a doença (Pelczar Jr. *et al.*, 1997).

Segundo Feng (1995), os métodos rápidos aprovados pelos órgãos oficiais só podem ser utilizados para controle, sendo que um resultado negativo é considerado definitivo, mas um resultado positivo é considerado presuntivo e deve ser confirmado por métodos padronizados.

### **1.8.1 Bolores e leveduras**

Bolores são os fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria- orgânica em decomposição. Leveduras são os fungos não filamentosos, normalmente disseminados por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas (Siqueira, 1995).

Segundo o mesmo autor, a presença de bolores e leveduras viáveis e em níveis elevados nos alimentos pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e matéria-prima com contaminação desmedida.

Siqueira (1995) refere que a contagem de bolores e leveduras é aplicável principalmente, na análise de alimentos ácidos, com pH menor a 4,5, alimentos parcialmente desidratados e farinhas.

### **1.8.2 *Staphylococcus aureus***

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram positivas com diâmetro variando de 0,5 e 1,5µm, imóveis e não formadoras de esporos (Silva, 1998; Franco e Landgraf, 2005). Os estafilococos são anaeróbios facultativos, apesar de se multiplicarem muito mais rápido na presença de oxigénio. Não possuem flagelo nem cílios, logo não tem movimento próprio. A temperatura ideal para a sua multiplicação é de 37°C, a mesma do corpo humano (Doyle, 1989). Encontram-se principalmente nos humanos e animais, estando presentes nas vias nasais, cabelos e pele de indivíduos saudáveis (Genigeorgis, 1989). São também encontrados no ar, esgotos, água, leite, alimentos e equipamentos de processamento de alimentos (Silva *et al.*, 1991; Forsythe, 2002).

*Staphylococcus aureus* assume importância quer por ser uma bactéria potencialmente patogénica, quer pelo fato da sua presença em contagens elevadas, indicar a falta de higiene na manipulação (Banwart, 1989; Franco e Landgraf, 2005).

É um agente patogénico oportunista, comportando-se geralmente como comensal, no entanto, algumas estirpes produzem toxinas. *S.aureus* destaca-se por ser um dos principais microrganismos responsável por surtos de intoxicação alimentar, sendo nestes casos os manipuladores a principal fonte de contaminação dos alimentos. Não possui grande capacidade para competir com os restantes microrganismos, pelo que não é comum o seu desenvolvimento e consequente produção de toxinas em alimentos crus, exceto no caso do leite (Hubbert *et al.*, 1996; Reinoso *et al.*, 2008).

Por outro lado, *S. aureus* é muito resistente ao processo de congelação e de descongelação, sobrevivendo em alimentos conservados a temperaturas inferiores a -20°C (Mossel *et al.*, 1995; ICMSF, 1996;). Caracteriza-se ainda pela sua capacidade de se desenvolver em meios com concentrações até 15% de NaCl, tornando os alimentos transformados e/ou conservados pelo processo da salga um perigo adicional para a saúde, uma vez que a diminuição de microrganismos competidores favorece a sua multiplicação. Como prevenção deve-se vigiar o estado de saúde e hábitos de trabalho dos manipuladores, não permitir o contacto dos manipuladores com feridas infetadas, manter

os alimentos a uma temperatura controlada entre os 7°C e os 48°C e aplicar as boas práticas de higiene. As temperaturas elevadas, a bactéria, é destruída, mas as suas toxinas são resistentes e permanecem ativas levando a disfunções do sistema digestivo. Grande parte das estirpes enterotoxigénicas de *S.aureus* produz coagulase e segundo, Desmarchelier *et al.*, (1999), na indústria alimentar seria preferível pesquisar *S.aureus* coagulase positiva em vez da designação de *S. aureus*.

Segundo Silva e Gandra (2004) o grupo de *Staphylococcus* coagulase positiva são os patogénicos mais importantes em alimentos, visto que a sua presença em alimentos processados pode indicar deficiência no processamento ou condições higiénicas inadequadas do processo; e as suas enterotoxinas, quando presentes no alimento, causam intoxicações alimentares.

### **1.8.3 Coliformes totais**

Pertencem a este grupo os géneros bacterianos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, incluindo cerca de 20 espécies, algumas tem origem no trato gastrintestinal de humanos e animais de sangue quente, outras não tem origem entérica (Silva *et al.*, 1997)

A principal razão para que sejam agrupados deve-se às suas muitas particularidades comuns. São todos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, resistentes a muitos agentes surfactantes e fermentam a lactose originando ácido e gás em 48h a 32°C (leite) ou 35-37°C (Ray, 1996).

### **1.8.4 *Escherichia coli***

A *E.coli*, é o melhor indicador de contaminação fecal de água conhecido até ao momento (Silva *et al.*, 1997).

A sua presença nos alimentos crus é considerada um indicador de contaminação fecal, direta ou indireta. A contaminação fecal direta acontece durante o processamento de matérias-primas de origem animal e devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores. A contaminação indireta pode ocorrer através das águas poluídas e de esgotos. Em alimentos processados pelo calor a sua presença é vista com grande preocupação (Ray, 1996).

### **1.8.5 Salmonella**

Segundo Shinohara et al. (2008), *Salmonella spp.* é um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os seus principais reservatórios.

É considerado como um dos principais agentes envolvidos em surtos de origem alimentar. Este microrganismo pode causar gastroenterite ligeira a septicemia grave ou infeções (Dias *et al.*, 2012).

O aumento da incidência da salmonelose provocada por alimentos contaminados, tais como: carne, frango, leite ou ovos, bem como vegetais, demonstra que, apesar dos avanços tecnológicos alcançados, este problema ainda é preocupante mundialmente. A vasta partilha de *Salmonella spp.* entre os animais, a existência de portadores assintomáticos e a sua continuidade no ambiente e nos alimentos contribuem para que este microrganismo adote um papel de grande relevância na saúde pública mundial, pelo que, devem ser adotados programas estáveis de controlo (Shinohara *et al.*, 2008).

### **1.8.6 Mesófilos e Psicrófilos**

Segundo a ICMSF (1984) o número de microrganismos aeróbios mesófilos (contagem em placa) encontrado num alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram efetuados de forma adequada. Esta determinação permite também obter informação sobre a alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, falta de controle no descongelamento ou desvios na temperatura da refrigeração estabelecida. Os psicrófilos são pouco importantes pela aptidão de crescer a temperaturas de refrigeração sendo que se multiplicam a temperaturas entre os 0°C e 20°C, se expostos à temperatura ambiente (25°C) alguns morrem. Entre temperaturas de 4 e 10°C os microrganismos psicrófilos deterioram alimentos armazenados por longos períodos.



# CAPÍTULO 2

## **Material e métodos**

- 2.1 Amostragem
- 2.2 Tratamento da amostra
- 2.3 Otimização da extração dos compostos fenólicos
- 2.4 Preparação do iogurte com e sem BS
- 2.5 Preparação dos extratos secos dos iogurtes
- 2.6 Determinação dos compostos fenólicos
- 2.7 Atividade antioxidante
- 2.8 Estabilidade microbiana e vida de prateleira
- 2.9 Parâmetros microbiológicos analisados

## **2.1 Amostragem**

A amostra utilizada neste estudo foram as bagas de sabugueiro. Estas, foram recolhidas em Vila Pouca de Salzedas pela Associação “Inovterra”. As bagas apresentavam-se no estado desidratado.

## **2.2 Tratamento da amostra**

As bagas de sabugueiro tiveram uma prévia limpeza manual para remoção de impurezas, tais como, folhas, pedaços de madeira entre outras. Posteriormente, as amostras foram congeladas para facilitar a sua trituração e serem liofilizadas. Após liofilização, as amostras foram sujeitas a diferentes processos de extrações hidro-etanólicas, variando a percentagem de etanol e o pH, com o objetivo de estabelecer o melhor sistema de extração dos compostos fenólicos. As diferentes combinações destes parâmetros seguiram o desenho experimental Box-Wilson.

Para a elaboração do iogurte, preparou-se um extrato de bagas de sabugueiro considerando a composição ótima do extrator hidro-etanólico definida pelo desenho experimental (etanol/pH).

## **2.3. Otimização da extração dos compostos fenólicos**

De forma a otimizar as condições de extração dos compostos fenólicos a partir da baga de sabugueiro, recorreu-se ao software R para definir um desenho experimental para aplicar a metodologia de superfície de resposta. Neste estudo pretendeu-se avaliar a influência de dois fatores na solução extratora hidro-etanólica: percentagem de etanol e pH (acertado pela concentração de HCl). Utilizou-se o desenho experimental Box-Wilson com pontos centrais (bloco 1) e expandido com um grupo de pontos "estrela" (bloco 2), a fim de estimar um modelo polinomial de segundo grau para a variável de resposta, considerando-se essas duas variáveis fatoriais.

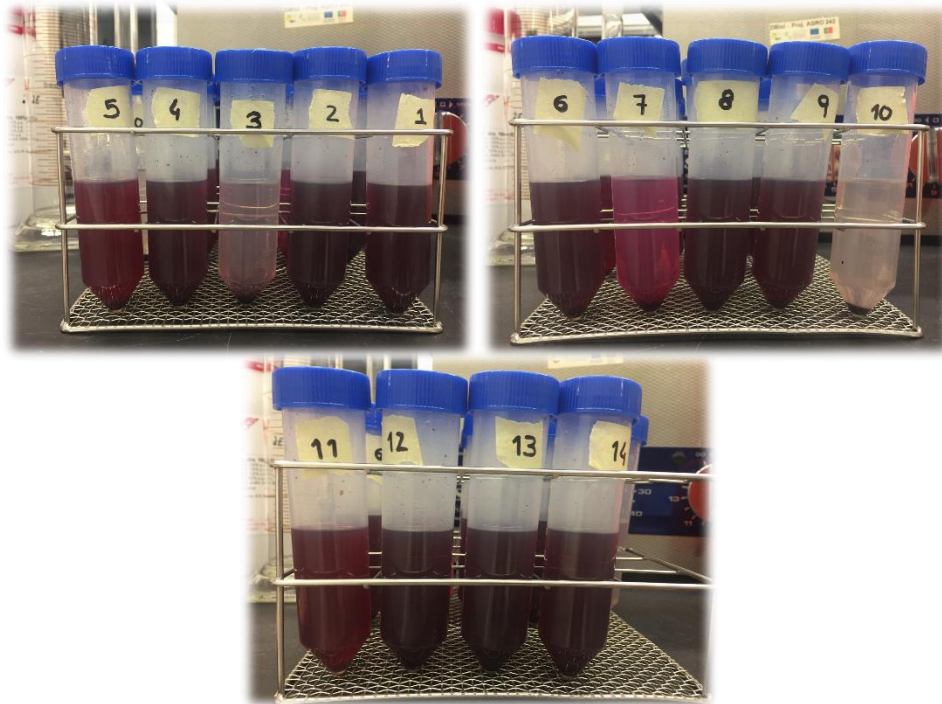
### 2.3.1. Preparação das soluções

As soluções hidro-etanólicas de extração de compostos fenólicos da baga de sabugueiro preparadas estão representadas na Tabela 3, tendo-se estabelecido 6 repetições do ponto central. Em cada um destes ensaios usaram-se 0,1 g de baga de sabugueiro e 25 mL da respetiva solução extratora. A percentagem de etanol variou entre os valores 24,6 e 95,4%, e os valores de pH, entre 0,9 e 5,1. Estes intervalos de valores foram definidos tendo em atenção os resultados de trabalho anteriores (Paula *et al.*, 2017).

**Tabela 3-** Desenho experimental.

		HCl, mol/L	pH	Etanol, %	Solução inicial	
					massa, g	V, mL
Bloco I	1	1,00E-03	3,00	60	0,1	25
	2	1,00E-03	3,00	60	0,1	25
	3	3,16E-05	4,50	85	0,1	25
	4	1,00E-03	3,00	60	0,1	25
	5	3,16E-02	1,50	35	0,1	25
	6	3,16E-05	4,50	35	0,1	25
	7	3,16E-02	1,50	85	0,1	25
Bloco II	1	1,00E-03	3,00	60	0,1	25
	2	1,00E-03	3,00	24,6	0,1	25
	3	1,00E-03	3,00	95,4	0,1	25
	4	1,32E-01	0,88	60	0,1	25
	5	7,56E-06	5,12	60	0,1	25
	6	1,00E-03	3,00	60	0,1	25
	7	1,00E-03	3,00	60	0,1	25

A extração dos compostos fenólicos foi efetuada com agitação das soluções com a baga de sabugueiro durante 12 horas (efetuada over-night num agitador orbital), as soluções foram analisadas pelo método do Folin Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999) nas soluções hidro-etanólicas. Na Figura 7 mostram-se as cores obtidas para os 14 ensaios efetuados.



**Figura 7-** Tubos Falcon com os extratos obtidos nos 14 ensaios definidos pelo desenho experimental.

### **2.3.2 Extração da baga de sabugueiro**

O extrato da baga de sabugueiro preparado para servir de aditivo alimentar no iogurte, foi obtido por mistura de 50 g do extrato seco com 1250 ml de solução hidroetanólica contendo pH a 0,9 e etanol a 60%. Após 12 horas de extração com agitação, a amostra foi filtrada para um matraz (previamente lavado com etanol, seco e pesado). Nas Figuras 8 e 9 mostra-se o extrato obtido da baga de sabugueiro e o processo de filtração, respetivamente.



**Figura 8-** Solução da BS.



**Figura 9-** Filtração do extrato de baga de sabugueiro.

Posteriormente, o solvente do extrato foi evaporado com um evaporador rotativo (Rotavapor Buchi RE 111 com um Buchi 461 banho-maria, 2002), à temperatura de 50°C. O matraz com o extrato foi colocado na estufa à temperatura de 40°C, até ter peso constante.

## 2.4 Preparação do Iogurte com e sem baga de sabugueiro

A preparação dos iogurtes foi realizada no laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária (Instituto Politécnico de Bragança). Preparou-se 1 kg de iogurte, que foi subdividido em quatro porções com o objetivo de obter as seguintes subamostras: (A) uma porção de iogurte com 0,1% de sorbato de potássio; (B) duas porções de iogurte com 0,1 e 0,2% de extrato de sabugueiro e (C) uma porção de iogurte com 0,05% de sorbato de potássio e 0,1% de baga de sabugueiro. O iogurte produzido foi do tipo “sólido” e formulado com cultura láctica comercial contendo as espécies bacterianas *Lactobacillus acidophilus*,  $1 \times 10^6$  UFC/g; *Bifidobacterium*,  $1 \times 10^6$  UFC/g and *Streptococcus thermophilus*  $1 \times 10^6$  UFC/g. A preparação do iogurte seguiu as recomendações do fabricante (BioRich®, Christian Hansen, Horsholm, Dinamarca). Inicialmente, 1 L de leite meio-gordo UHT e leite em pó (1,0%, m/v) foram levados à ebulição. Imediatamente, as amostras foram submetidas a arrefecimento rápido (banho de gelo) até atingir  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ , momento em que a cultura láctica foi adicionada. Os produtos foram colocados em recipientes de vidro hermético (capacidade de 500 g) e mantidos em banho-maria durante a noite. As amostras foram transferidas para o frigorífico ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e deixadas por 24 horas. A Figura 10 mostra as quatro porções de iogurte com o objetivo de preparar o controlo e efetuar a adição dos preservativos, o sorbato de potássio e/ou extrato de baga de sabugueiro.



**Figura 10-** Amostras de iogurte natural.

Posteriormente, o coágulo foi partido, sendo adicionado o sorbato de potássio e o extrato da baga de sabugueiro. As seis amostras de iogurte consistiram em:

- 1-Extrato de sabugueiro (0,1% m/v);
- 2-Extrato de sabugueiro (0,2% m/v);
- 3-Extrato de sabugueiro (0,4% m/v);
- 4-Sorbato de potássio (0,05% m/v) e extrato de sabugueiro (0,1% m/v);
- 5-Sorbato de potássio (0,05% m/v) e extrato de sabugueiro (0,2% m/v);
- 6-Sorbato de potássio (0,1% m/v);

As amostras de iogurte foram preparadas em duplicado e divididas para depois serem analisadas em dois tempos diferentes (0 e 21 dias de vida de prateleira), isto é, para cada tempo de ensaio foi utilizado um iogurte diferente. Na Figura 11 mostra-se o aspeto visual da adição da baga de sabugueiro ao iogurte (amostra 5 e 4):

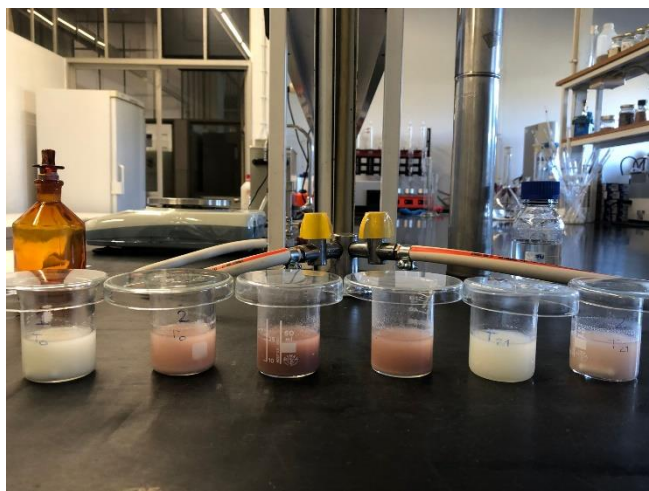


**Figura 11-** Amostra 5 e 4 de iogurte com extrato de sabugueiro (da esquerda para a direita).

## 2.5 Extratos dos iogurtes

Para a determinação dos fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (FRAP e DPPH), as amostras do tempo 0 dias (inicial) e do tempo 21 dias (final) foram liofilizadas. Posteriormente, pesaram-se aproximadamente 1,0g de cada amostra à qual foram adicionados 25 ml de uma solução de etanol a 60% (p/v) e pH 0,9. As soluções foram colocadas em agitação (1 hora) e posteriormente filtradas para matrizes,

devidamente pesados, que foram posteriormente colocados no evaporador rotativo (Rotavapor Buchi RE 111) a uma temperatura de 50°C. De seguida, calculou-se o rendimento da extração através da diferença de pesos do matraz (vazio e com o extrato seco). O extrato obtido foi dissolvido em 10 ml de uma solução de etanol a 60% e a pH 0,9 (Figura 12).



**Figura 12-** Ensaio de iogurtes com e sem baga de sabugueiro para o T0 e T21 dias.

## 2.6 Determinação de compostos fenólicos

Na determinação de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por Singleton *et al.*, 1999 e os flavonoides totais foram determinados de acordo com Zhishen *et al.* (1999), com algumas modificações.

As concentrações obtidas para as diferentes soluções de iogurtes estão compreendidas entre 22,34 e 43,69 g/L. Todas as análises foram efetuadas em duplicado.

### 2.6.1 Fenóis totais

Para a determinar a curva de calibração para análise dos fenóis totais, o composto utilizado foi o ácido gálico (AG). A solução mãe foi preparada por pesagem de 0,1 g de ácido gálico que foram dissolvidos em 100 ml de água desionizada. As concentrações usadas foram obtidas por medição dos volumes 0,1; 0,25; 0,5; 0,6; 0,75; 1,0 e 1,5 ml da solução mãe para balões de 25 ml que foram aferidos com água desionizada. As soluções foram medidas após a mistura de 0,5 mL de cada solução com 2,5 ml de Folin-Ciocalteu a 10% e 2 ml de carbonato de sódio a 75 g/L. O branco foi preparado com 0,5 ml de água

desionizada e os reagentes (2,5 ml de Folin-Ciocalteu e 2 ml de carbonato de sódio). Após decorridas 2 horas de estabilização, foram efetuadas as leituras ao comprimento de onda 760 nm.

Na análise das amostras de iogurtes para os dois tempos em estudo, misturou-se 0,5 ml do iogurte com 2,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu e 2 ml de carbonato de sódio. Após a mistura, a solução ficou a repousar durante 2 horas à temperatura ambiente, sendo posteriormente medida a absorvância a 760 nm.

## **2.6.2 Flavonoides totais**

Na determinação da curva de calibração para análise dos flavonoides totais usou-se como padrão a quercetina (Q). Para a preparação da solução mãe, pesaram-se 0,05 g de quercetina para um balão de 50 ml que foi aferido com etanol. As concentrações utilizadas das soluções padrão de calibração foram obtidas por medição dos volumes 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 ml para balões de 10 ml. Todos os balões volumétricos foram aferidos com etanol. A análise dos flavonoides foi feita por mistura de 0,5 ml de solução padrão ou amostra, com 2 ml de água destilada e 0,15 ml de nitrato de sódio a 5%. Após intervalo de 6 minutos, foi adicionado 0,15 ml de cloreto de alumínio a 10%. As soluções ficaram em repouso durante mais 6 minutos e, de seguida, adicionou-se 2 ml de NaOH a 4% e 0,2 ml de água destilada. Após, 15 minutos de repouso no escuro, a leitura das absorvâncias das amostras foi efetuada a 510 nm.

## **2.7 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos: Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) descrito por Pulido *et al.* (2000); efeito bloqueador dos radicais livres (DPPH) de acordo com o reportado por Hatano *et al.*, 1988. As concentrações testadas dos diferentes iogurtes, estão compreendidas entre 22,34 e 43,69 g/L de amostra de iogurte. Todas as análises foram efetuadas em duplicado.

### 2.7.1 Metodologia FRAP

A metodologia FRAP consiste numa alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, bem como, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas.

Para a preparação da solução FRAP foram misturadas três soluções: 150 ml da solução tampão pH 3,6 ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), 15 ml de TPTZ  $1,0\times 10^{-2}$  M e 15 ml da solução de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a  $2,0\times 10^{-2}$  M. As soluções padrão de calibração foram obtidas por medição dos volumes 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 ml para balões de 20 ml. Os balões volumétricos foram aferidos com etanol. Para determinar a atividade antioxidante pelo método de FRAP misturou-se 0,1 ml da solução padrão ou amostra, 3 ml do reagente FRAP e 0,3 ml de água destilada. A solução ficou em repouso durante 6 minutos, sendo posteriormente medida a absorvância a 540 nm.

### 2.7.2 Análise do DPPH

Na avaliação do poder redutor pela metodologia do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), transferiram-se 0,3 ml das soluções para tubos de ensaio e 2,7 ml do reagente DPPH. Os tubos de ensaio foram agitados no vortex, futuramente a solução ficou a repousar durante 1 hora no escuro. Ao fim deste tempo mediu-se a absorvância das soluções a 517 nm. O efeito bloqueador do DPPH foi calculado pela percentagem de descoloração do DPPH usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_s)/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

sendo,  $A_s$  a absorvância da solução quando o extrato da amostra foi adicionado a um nível específico, e  $A_{\text{DPPH}}$ , a absorvância da solução de DPPH.

Na determinação da curva de calibração da atividade antioxidante (DPPH) utilizou-se o Trolox como composto padrão. Para a preparação da solução mãe, pesaram-se 0,0063 g de Trolox para um balão de 50 ml que foi aferido com etanol. As concentrações utilizadas foram obtidas por medição dos volumes 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 para balões de 10 ml, que foram aferidos com etanol. A análise de DPPH foi realizada às

5 concentrações anteriores e à solução mãe. Após 1 hora no escuro as absorvâncias foram efetuadas a 517 nm.

## **2.8 Estabilidade microbiana e vida de prateleira**

Para determinar o tempo de vida de prateleira das amostras de iogurtes com e sem EBS sob refrigeração, os parâmetros avaliados foram contagem total de aeróbios mesófilos e contagem total de psicrófilos, contagem total de bolores e leveduras, contagem total de coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*), pesquisa de *Salmonella* e contagem total de *Staphilococcus aureus* nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias.

Os iogurtes encontravam-se no estado sólido no frigorífico, mantidos no frio a cerca de 3°C até serem utilizados. Todo o material e os respetivos meios de cultura foram preparados e esterilizados de acordo com o descrito nas normas portuguesas e/ou europeias.

### **2.8.1. Preparação de amostras para análises microbiológicas**

Pesou-se 10 g de cada amostra e adicionou-se 90 ml de solução de Ringer, num frasco estéril, agitou-se e obteve-se a solução mãe ( $10^{-1}$ ). Para obtenção da diluição  $10^{-2}$  retirou-se 1 ml da solução anterior e colocou-se num tubo de ensaio contendo 9 ml de solução de Ringer. Seguidamente obteve-se a diluição  $10^{-3}$  retirando 1 ml da solução anterior e adicionando a 9 ml de solução de Ringer contidos num tubo. Os ensaios foram efetuados em duplicado.

### **2.8.2. Bolores e leveduras**

A contagem de bolores e leveduras foi realizada tendo como referência a NP 2077 (1985), com sementeira por espalhamento à superfície. Foi distribuído 0,1 ml de cada uma das diluições por placas de petri contendo meio de cultura Ágar Rosa de Bengala. As placas foram incubadas a 25°C durante 48 horas a 5 dias, os resultados foram expressos em UFC/g.

### **2.8.3. Contagem de Coliformes Totais e *Escherichia coli***

Na identificação e contagem de coliformes foi utilizado o Kit simplate da Bio Control. Procedeu-se segundo as recomendações do fabricante. O meio de cultura fornecido foi hidratado previamente em 9 ml de água destilada, inoculado com 1 ml da solução mãe e homogeneizado com auxílio do vórtex. O mesmo processo foi feito de igual modo para as várias diluições. O conteúdo foi vertido para a placa contendo 84 poços. O líquido foi espalhado pelos poços com movimentos circulares e com uma velocidade lenta e, por fim, foi retirado o excesso. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. A identificação e enumeração dos coliformes totais são realizadas através da contagem do número de poços em que ocorreu mudança de cor do meio de cultura. A identificação e enumeração da *E. coli* foi realizada através da contagem do número de poços em que se observou fluorescência, após a exposição da placa a uma lâmpada de UV a 365 nm. O número de coliformes presentes na amostra foi calculado de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante.

### **2.8.4. Pesquisa de *Salmonella spp***

Para determinar a presença de *Salmonella spp* foi utilizada o “1-2 TEST” desenvolvido pela Biocontrol. As análises foram efetuadas de acordo com as recomendações do fabricante. Após inoculação procedeu-se à incubação a 37°C durante 24 horas. O resultado foi considerado positivo quando ocorreu a formação de uma banda branca (Imunobanda) em forma de U ou de menisco.

### **2.8.5. Contagem de *Staphylococcus aureus***

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* foi realizada através da NP 4400-1 (2002), por sementeira à superfície de 0,1 ml de cada diluição decimal em placas contendo o meio seletivo de Baird-Parker (Merk, Alemanha) enriquecido com gema de ovo. As placas foram inoculadas 24 horas a 37°C. Os resultados foram expressos em UFC/g. As colônias de *Staphylococcus aureus* negras com halo transparente, foram repicadas e incubadas a 37°C durante 24 h para posterior pesquisa da enzima coagulase positiva. Para tal, retirou-se uma porção de cada uma das colônias selecionadas e semeou-se em tubos com BHI

(Brain Heart Infusion). Incubou-se a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24h. Em seguida, juntou-se asepticamente 0,1 mL de cada cultura a 0,3 mL de plasma de coelho em tubos de hemólise e incubou-se a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após 4 a 6 h examinou-se a coagulação do plasma. Consideram-se reação coagulase positiva quando o coágulo ocupou mais de  $\frac{3}{4}$  do volume inicialmente ocupado pelo líquido.

### **2.8.6. Contagem total de mesófilos totais e psicrófilos**

A contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos totais foi efetuada segundo a Norma Portuguesa (NP) 4405:2002 e a contagem dos microrganismos aeróbios psicrófilos totais foi efetuada segundo a NP 2307 (1987). Estas análises foram feitas em duplicado, 1 ml de cada diluição, em ágar para Contagem (PCA Oxoid CM0463B, Hampshire, England) por incorporação a incubar a  $37^\circ\text{C}/24-48$  h (Dale Morton, 2001). Outras placas com o mesmo ágar (PCA), mas feitas por espalhamento (0,1ml) foram a incubar a  $7^\circ\text{C}$  durante 8 dias, estas bactérias são chamadas de psicrófilos. De seguida procedeu-se à contagem das colónias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por gramas de produto analisado (UFC/g).

## **2.9 Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada recorrendo ao Excel da Microsoft e ao software livre R (versão R 4.0.2 GUI 1.72, R Foundation for Statistical Computing).

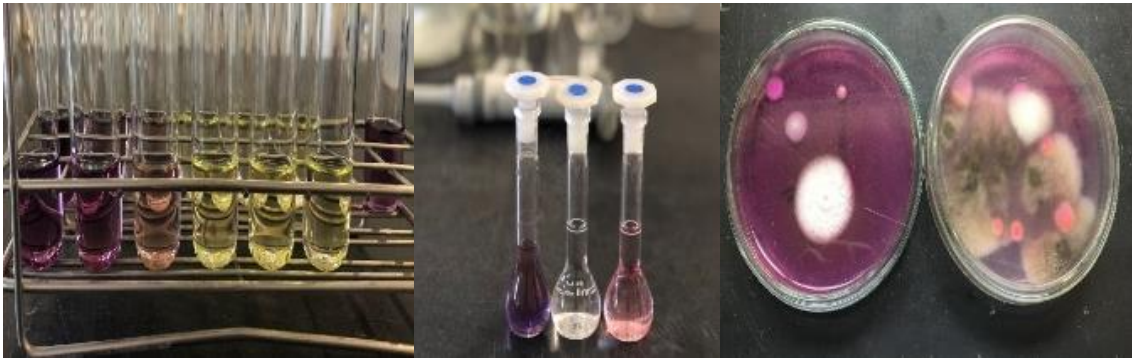
A análise descritiva dos dados foi efetuada recorrendo às estatísticas média e desvio padrão.

As calibrações analíticas envolveram o ajuste linear entre os sinais e as respetivas concentrações das soluções padrão de calibração, sendo o grau de ajuste avaliado visualizado no gráfico dos sinais em função das concentrações e pelo valor de coeficiente de correlação.

Aplicou-se um desenho experimental Box-Wilson com pontos centrais (bloco 1) e expandido com um grupo de pontos "estrela" (bloco 2), com o objetivo de ajustar um modelo polinomial de segundo grau para as variáveis de resposta. O modelo ajustado foi obtido por aplicação da metodologia de superfície de resposta, tendo-se testado a significância dos termos associados aos fatores principais (variáveis em teste), às interações dos fatores e aos fatores quadráticos. O gráfico contour foi usado para

representar num espaço bidimensional uma superfície tridimensional, onde a variável  $z$  (resposta) é representada por fatias de  $z$  constantes, chamadas contornos. Para mostrar o desempenho do modelo ajustado, usa-se o gráfico da relação linear entre as respostas previstas pelo modelo obtido e as obtidas experimentalmente. A capacidade de previsão é avaliada se o valor do declive desta relação é próximo da unidade (declive = 1), a ordenada da origem é próxima do zero (ordenada na origem = zero) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é próximo da unidade ( $R^2 = 1$ ).

A análise de variâncias (ANOVA) de dois fatores foi aplicada com o intuito de avaliar se havia diferenças significativas (valores de  $p > 0,05$ ) entre as médias dos fatores analisados e dos termos de interação para as diferentes respostas. Os gráficos boxplot foram usados para visualizar as variações obtidas entre os grupos de dados testados.



# CAPÍTULO 3

## Resultados e Discussão

3.1 Métodos quantitativos

3.2 Otimização da extração hidro-etanólico

3.3 Iogurte com e sem extrato de BS

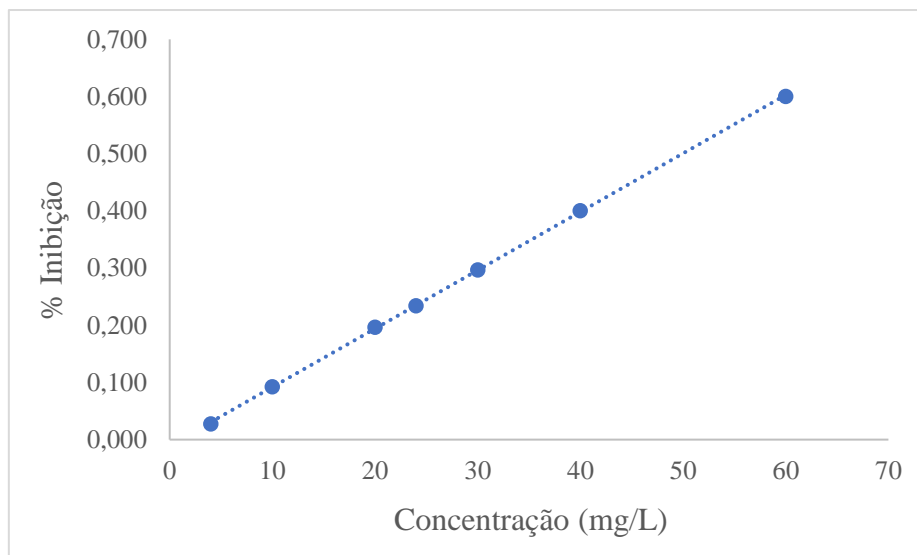
3.4 Avaliação microbiológica dos iogurtes

Este trabalho envolveu o estudo de otimização do processo extrativo dos compostos fenólicos da BS e dos compostos biológicos e propriedades bioativas do iogurte com e sem extrato de BS. Para tal, foram analisados cinco parâmetros quantitativos: compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas, atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. A determinação destes parâmetros nas amostras foi efetuada usando várias metodologias espectrofotométricas, cujos procedimentos foram descritos na secção 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7, apresentando-se a seguir os resultados das calibrações obtidas.

### 3.1 Métodos quantitativos

**Análise dos compostos fenólicos totais (CFT).** Para quantificar os grupos hidroxilo fenólicos presentes na amostra de BS, recorreu-se ao método do reagente Folin-Ciocalteu, usando como padrão o ácido gálico. Este método baseia-se numa reação de oxidação-redução, no qual o ião fenolato é oxidado em meio alcalino reduzindo o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no reagente Folin-Ciocalteu, originando coloração azul que absorve a 760 nm (Funari *et al.*, 2006).

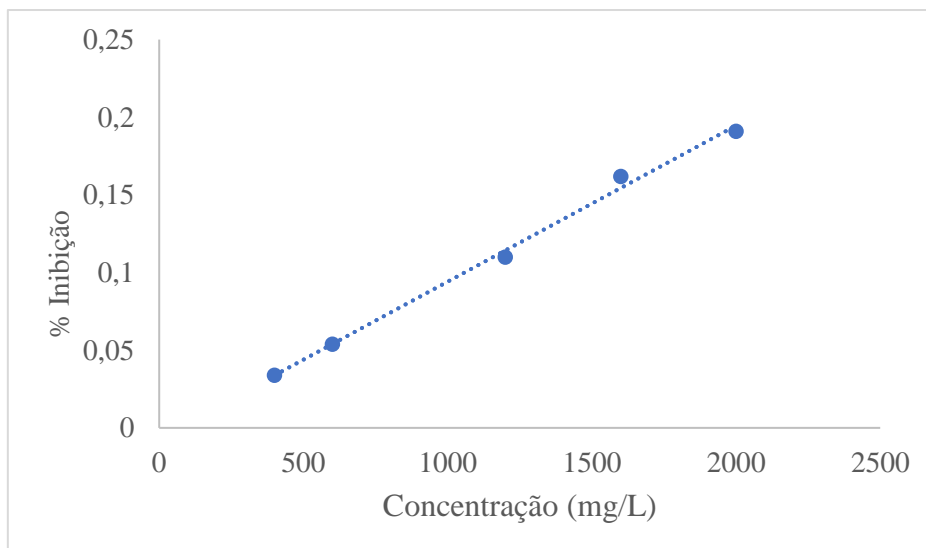
O teor em fenóis totais foi determinado utilizando concentrações de ácido gálico (AG) entre 4 e 60 mg/L. A Figura 13 apresenta o gráfico de calibração obtido entre os valores da absorvância e concentrações de AG, em que se pode verificar que os pontos experimentais estão praticamente sobrepostos na reta demonstrando um bom ajuste (valor de coeficiente de correlação (0,9999)). A equação da reta de calibração obtida foi  $y=0,0102x-0,0104$ .



**Figura 13-** Gráfico da curva de calibração de análise dos fenóis totais.

**Análise dos flavonoides totais (FT).** Na determinação de flavonoides totais, o método utilizado baseia-se na propriedade do catião alumínio para formar complexos estáveis com o hidroxilo dos flavonoides, formando um complexo de cor amarela (Funari *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 1997). Este permite determinar a quantidade de flavonoides presentes na amostra evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, sobretudo os ácidos fenólicos (Funari *et al.*, 2006).

Na Figura 14, apresenta-se o gráfico de calibração obtido, verificando-se que os pontos experimentais estão próximos da reta ajustada. O coeficiente de correlação foi de  $R= 0,9975$  que demonstra um ajuste aceitável. A equação da reta que representa o ajuste entre a absorvância e a concentração de quercetina foi  $y=0,0001x-0,0063$ .

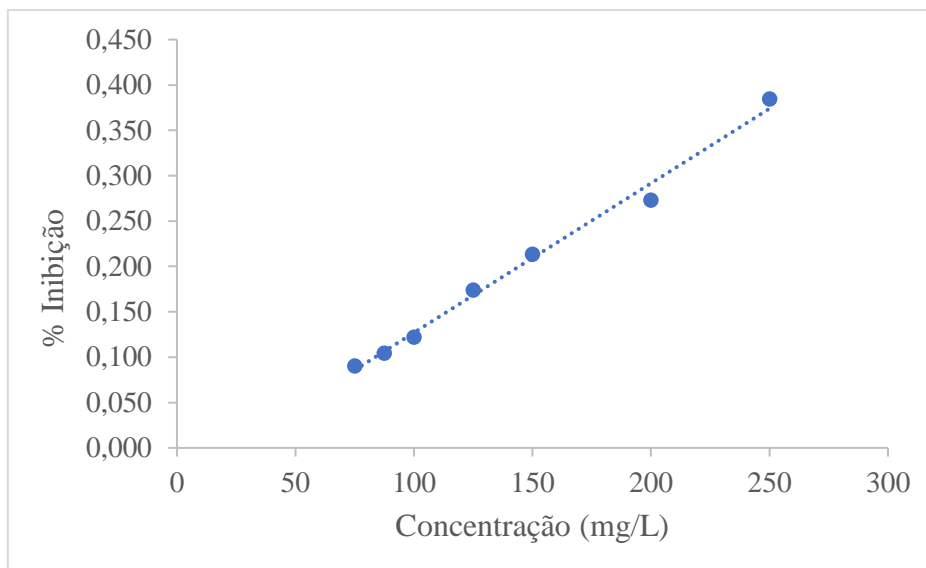


**Figura 14-** Gráfico da curva de calibração de análise dos flavonoides totais.

A atividade antioxidante das amostras foi medida pela metodologia FRAP e DPPH. Esta atividade consiste em atrasar ou inibir a oxidação de lípidos ou de outras moléculas, impedindo o desenvolvimento das reações em cadeia da oxidação (Zheng *et al.*, 2001).

**Metodologia FRAP.** A presença de antioxidantes provoca a redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /Ferricianeto a uma forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), resultando num complexo azul (Cottica *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2008).

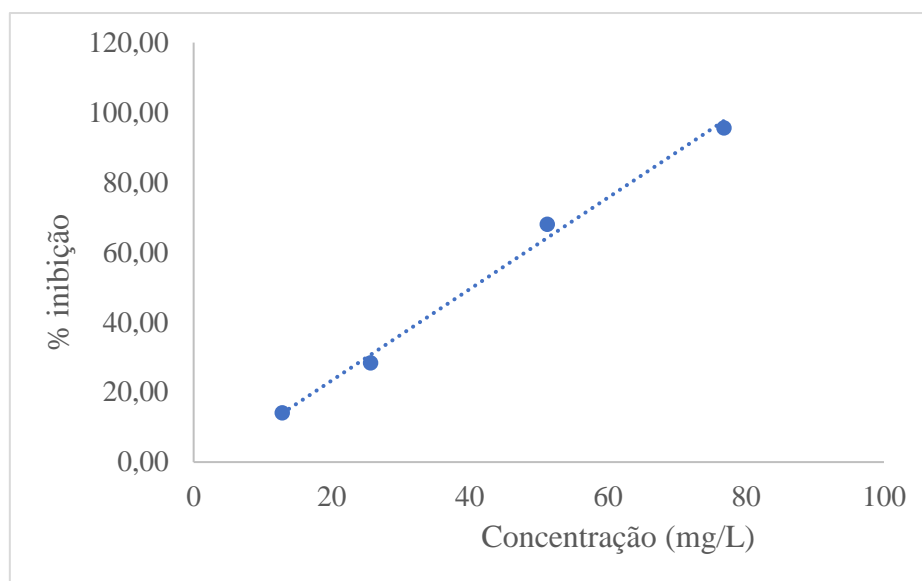
Na Figura 15, apresenta-se o gráfico de calibração obtido, verificando-se que os pontos experimentais estão próximos da reta ajustada, tendo-se obtido um coeficiente de correlação aceitável ( $R= 0,9958$ ). A reta obtida do ajuste obtida entre as absorvâncias e as concentrações de  $\text{FeCl}_3$  foi  $y=0,0016x-0,0377$ .



**Figura 15-** Gráfico da curva de calibração de análise por metodologia FRAP.

**Análise do DPPH.** O radical livre DPPH é um cromóforo extremamente estável que absorve a 517 nm e apresenta uma coloração violeta intensa. Quando um composto químico antioxidante reage com o DPPH, este é reduzido à forma de hidrazina, o seu elétron emparelha-se, o que resulta numa diminuição da cor para amarelo-claro (Cabral *et al.*, 2009).

Na Figura 16 mostra-se a reta ajustada entre as absorvâncias e as concentrações de DPPH, mostrando que os pontos experimentais estão próximos da reta ajustada, o que é verificado pelo valor aceitável do coeficiente de correlação 0,9970. A reta obtida do ajuste entre as absorvâncias e as concentrações de DPPH foi  $y=1,3074x-2,829$ .



**Figura 16-** Gráfico da curva de calibração de análise por metodologia DPPH.

### 3.2 Otimização da extração hidro-etanólico

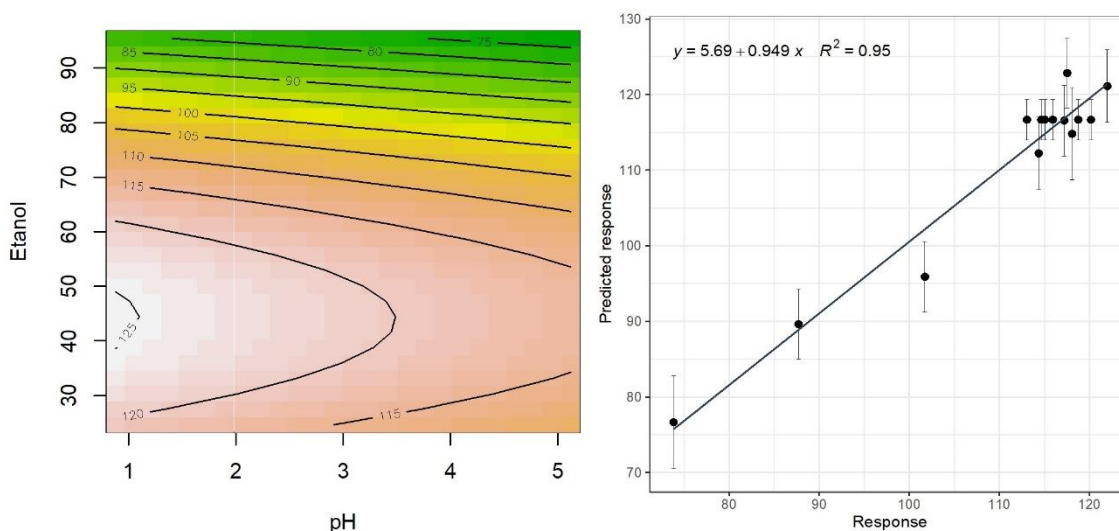
Este trabalho iniciou-se com o estudo da otimização de extração dos compostos fenólicos da BS através do desenho experimental compósito central de dois fatores: pH e % de etanol. O estudo envolveu 14 ensaios com 2 níveis de pH (nível -1: 0,88; nível +1: 5,12) e de % de etanol (nível -1: 24,6%; nível +1: 95,4%). A massa de BS usada foi de 0,10 g. Como respostas do desenho experimental usaram-se os parâmetros: compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas, DPPH e FRAP.

**Compostos fenólicos totais (CFT).** Aos resultados de compostos fenólicos totais obtidos aplicou-se a metodologia de superfície de resposta tendo-se verificado que a constante ( $p < 0,001$ ), o efeito principal % de etanol ( $p < 0,001$ ) e o termo quadrático da % Etanol ( $p < 0,001$ ) foram significativos. O modelo obtido apresentou um coeficiente de determinação de 0,949 ( $R^2$ ), indicando que o modelo justifica 94,9% da variabilidade dos dados. O modelo final foi:

$$\text{Concentração CFT} = 95,13 - 2,09 \times \text{pH} + 1,47 \times \% \text{Etanol} - 0,017 \times (\% \text{Etanol})^2$$

Na Figura 17 apresentam-se os gráficos de *contour* e de avaliação da resposta prevista pelo modelo obtido em função dos valores experimentais de concentração de

compostos fenólicos totais. Como se pode verificar no gráfico de *contour*, o ótimo encontra-se na zona do pH de 0,88 até 3,00 e na zona da % Etanol de 24,6 até 70%. O gráfico de relação entre respostas previstas e experimentais mostra que o ajuste é próximo do teórico (declive 0,949  $\approx$  1), mas com ordenada da origem afastada do valor teórico zero (ordenada na origem = 5,69  $\neq$  zero). Estes resultados podem ser justificados pelo facto de o modelo obtido só permitir justificar 95% da variabilidade dos dados.



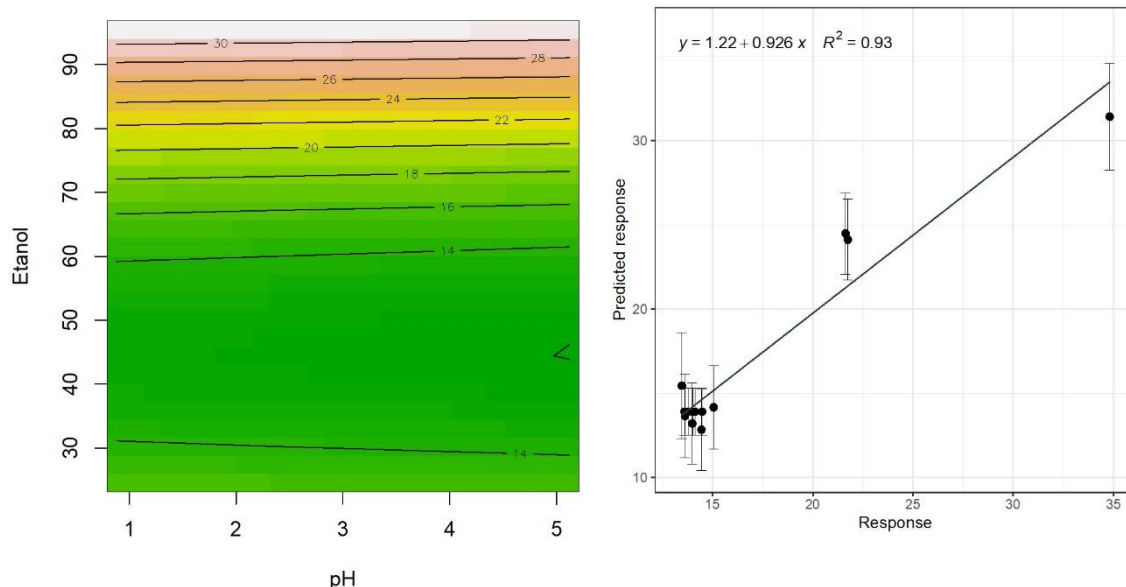
**Figura 17-** Gráficos de *contour* e da resposta prevista pelo modelo RSM em função da concentração experimental de CFT.

**Flavonoides Totais (FT).** A aplicação da metodologia de superfície de resposta indicou que a constante ( $p < 0,001$ ), o efeito principal % Etanol ( $p = 0,0038$ ) e o termo quadrático da % Etanol ( $p < 0,001$ ) eram significativos. O modelo obtido tinha um coeficiente de determinação de 0,926 ( $R^2$ ), ou seja, justifica 92,6% da variabilidade dos dados. O modelo final obtido foi:

$$\text{Concentração FT} = 28,11 - 0,12 \times \text{pH} - 0,69 \times \% \text{Etanol} + 0,0076 \times (\% \text{Etanol})^2$$

A Figura 18 apresenta os gráficos de *contour* e de avaliação da resposta prevista pelo modelo obtido em função dos valores experimentais de concentração de FT. O gráfico de *contour* mostra que o ótimo não depende do pH, podendo-se seleccionar qualquer valor no intervalo de 0,88 até 5,12, verificou-se que a maior quantidade de extração de flavonoides totais era observada em % elevadas de etanol. O gráfico de

relação entre respostas teóricas ( $y = 0x + 1$ ) e experimentais ( $y = 0,926x + 1,22$ ) mostra diferenças entre sugerindo que o modelo obtido só permite justificar 93% da variabilidade dos dados.

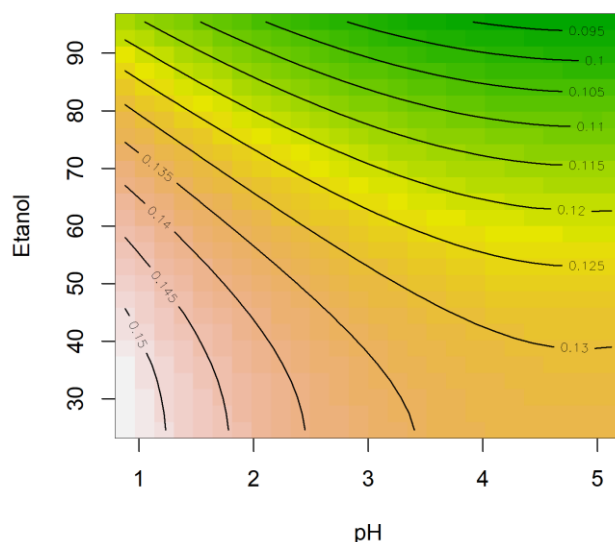


**Figura 18-** Gráficos de *contour* e da resposta prevista pelo modelo RSM em função da concentração experimental de flavonoides totais.

**Antocianinas.** A metodologia das antocianinas consistiu na avaliação na cor do extrato, que demonstra variação significativa nos ensaios do desenho experimental. O resultado da metodologia de superfície de resposta indicou que estes sinais não mostravam qualquer relação significativa com os 2 fatores estudados: pH e % Etanol. A leitura das absorvâncias não foi significativa, embora o modelo obtido apenas justifique 77,9% da variabilidade dos dados.

Na Figura 19 apresenta-se o gráfico de *contour* que mostra uma tendência de aumento do sinal da cor (antocianinas) para valores mais baixos quer de pH quer de %Etanol.

Considerando todos os resultados obtidos pela execução do desenho experimental com a aplicação do método de superfície de resposta, a composição do solvente extrator foi selecionada de forma que a extração fosse representativa em compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides): pH 0,88 e % Etanol 60%.



**Figura 19-** Gráficos de *contour* e da resposta prevista pelo modelo RSM em função da concentração experimental de antocianinas.

### 3.3 Iogurte com e sem extrato de baga de sabugueiro

Os resultados que iremos apresentar nas secções seguintes referem-se, ao estudo comparativo de iogurtes adicionados de 3 concentrações diferentes de extrato de BS (0,1; 0,2 e 0,4%); com sorbato de potássio (0,05%) 2 níveis de extrato de BS (0,1 e 0,2%); iogurtes adicionados com sorbato de potássio (0,1%) (controlo).

Com este estudo pretendeu-se averiguar, se a adição de extrato de BS ou a mistura de sorbato e extrato de BS exerce efeito positivo na conservação do iogurte, isto é, se é possível substituir total ou parcialmente um aditivo químico por um produto natural. Também se pretende apurar se o BS induz alterações na concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

As diferentes amostras foram avaliadas no tempo inicial (T0) e no final (T21), todas as análises foram realizadas em duplicado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4-** Parâmetros químicos dos iogurtes.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Amostras</b>	<b>Ensaio do iogurte</b>	<b>Fenóis totais (mg eq AG/g)</b>	<b>Flavonoides (mg eq Q/g)</b>	<b>DPPH (mg trolox/g)</b>	<b>FRAP (mg FeII/g)</b>
<b>0</b>	1	iogurte com 0,1% extrato de BS	5,22±0,23	0,054±0,004	0,83±0,01	4,87±0,15
	2	iogurte com 0,2% extrato de BS	7,36±0,25	0,070±0,004	0,85±0,22	6,01±0,55
	3	iogurte com 0,4 % extrato de BS	18,41±0,42	0,098±0,002	1,99±0,012	7,55±0,38
	4	iogurte com 0,05% de sorbato + 0,1% de extrato BS	6,71±0,27	0,064±0,002	1,13±0,10	6,26±0,72
	5	iogurte com 0,05% de sorbato + 0,2% de extrato BS	5,92±0,02	0,030±0,002	1,60±0,002	3,05±0,07
	6	iogurte com sorbato 0,1%	6,05±0,02	0,038±0,004	0,98±0,14	5,16±0,01
<b>21</b>	1	iogurte com 0,1% extrato de BS	3,48±0,06	0,020±0,000	0,92±0,05	2,76±0,32
	2	iogurte com 0,2% extrato de BS	6,62±0,41	0,045±0,003	1,32±0,03	5,60±0,15
	3	iogurte com 0,4 % extrato de BS	22,89±0,62	0,066±0,002	1,53±0,004	5,58±0,16
	4	iogurte com 0,05% de sorbato + 0,1% extrato de BS	6,22±0,09	0,048±0,003	1,26±0,03	5,28±0,78
	5	iogurte com 0,05% de sorbato + 0,2% extrato de BS	12,28±0,35	0,075±0,004	1,88±0,003	5,46±0,32
	6	iogurte com sorbato 0,1%	5,27±0,26	0,043±0,006	1,06±0,03	5,18±0,64
	Extrato de BS		40,80±0,21	1,27±0,05	21,69±0,08	139,81±1,29

No T0 a quantidade de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante aumentaram consoante o incremento do extrato de BS adicionado nas amostras de iogurte. Constatou-se que para este tempo, a amostra 3 foi a que apresentou maior quantidade de compostos bioativos e atividade antioxidante. Na amostra 1, os valores obtidos para os fenóis totais e para a atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH foram os mais baixos, enquanto na amostra 5 (mistura de sorbato 0,05 com 0,2% de extrato de BS) os valores mais reduzidos se observam nos flavonoides e a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP.

Ao fim de 21 dias de armazenamento, foi na amostra 5 que se observaram valores mais elevados no teor em flavonoides totais na atividade antioxidante pelo método DPPH, enquanto na amostra 3 os valores mais elevados foram fenóis totais. A amostra 6 (controlo) foi a que apresentou menores quantidades em todos os parâmetros analisados.

Os nossos resultados foram corroborados pelas observações de Silva *et al.* (2017), em que verificaram que os subprodutos de BS possuem um elevado potencial antioxidante. O elevado teor fenóis e flavonoides do extrato BS permite inferir que a adição deste extrato ao iogurte traz benefícios à saúde do consumidor, pois de acordo com Andrade *et al.* (2017), os fenóis e os flavonoides são os principais componentes responsáveis por diversas atividades biológicas. Soares *et al.* (2008), avaliou o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de uva Niágara obtendo valores compreendidos entre  $2,19 \pm 0,06$  a  $1,027 \pm 0,88$  mg eq. AG/ g de amostra. Sales *et al.* (2012) em extratos hidro alcoólicos do bagaço de uva obteve valores de 4,74mg eq. AG/g de amostra para a capacidade antioxidante. Os valores obtidos por estes investigadores foram inferiores aos encontrados no nosso estudo com o extrato de BS:  $40,80 \pm 0,21$  mg eq AG/g para os fenóis totais,  $1,27 \pm 0,05$  mg eq. Q/g de amostra para os flavonoides totais, atividade antioxidante (DPPH)  $21,69 \pm 0,08$  mg trolox/g de amostra e (FRAP).  $139,81 \pm 1,29$  mg Fe II/g de amostra.

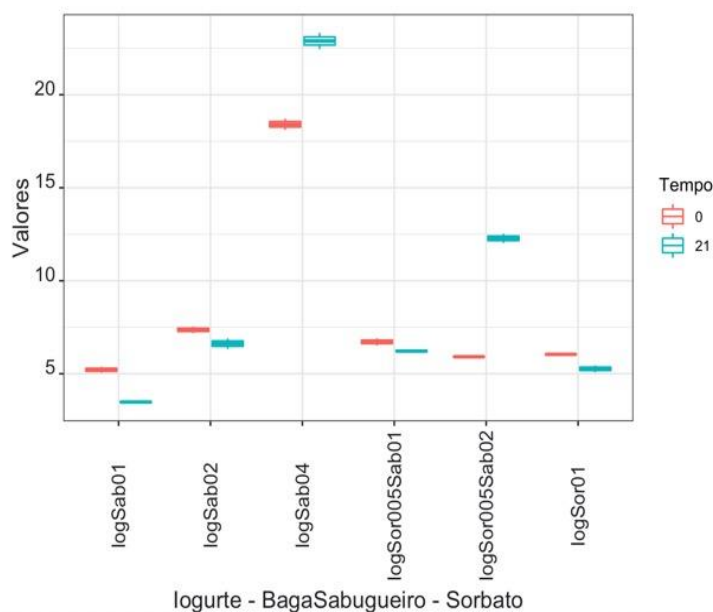
A análise de variâncias (ANOVA) de dois fatores (“Tempo” e “Amostras”) foi aplicada com o intuito de avaliar se havia diferenças significativas entre os ensaios em estudo. Na Tabela 5, apresentam-se os valores de p obtidos para os dois fatores, bem como do termo “Interação”, para os teores de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e FRAP. Da análise dos resultados constatou-se que o termo interação foi significativo para os 4 parâmetros analisados ( $p < 0,001$ ),

indicando que, para explicar a variabilidade dos dados analíticos será necessário analisar os efeitos dos dois fatores em simultâneo.

**Tabela 5-** Valores obtidos da ANOVA.

Parâmetro	Tempo	Amostras	Interação
<b>Fenóis</b>	<0,001	<0,001	<0,001
<b>Flavonoides</b>	<0,001	<0,001	<0,001
<b>DPPH</b>	0,0133	<0,001	<0,001
<b>FRAP</b>	0,0142	<0,001	<0,001

**Compostos fenólicos totais.** Na Figura 20 estão sumariados, na forma de boxplot, os resultados obtidos para os compostos fenólicos totais para os vários ensaios realizados. Os tempos (0 e 21 dias) estão representados com diferentes cores (vermelho T0 e azul T21).



**Figura 20-** Boxplot dos dados dos compostos fenólicos totais associados aos resultados da ANOVA 2 fatores.

Na Tabela 4 e na Figura 20, observaram-se os teores em fenóis totais mais reduzidos em T21, variando entre  $3,48 \pm 0,06$  e  $22,89 \pm 0,63$  mg eq AG/g de amostra, respetivamente na amostra 1 e 3.

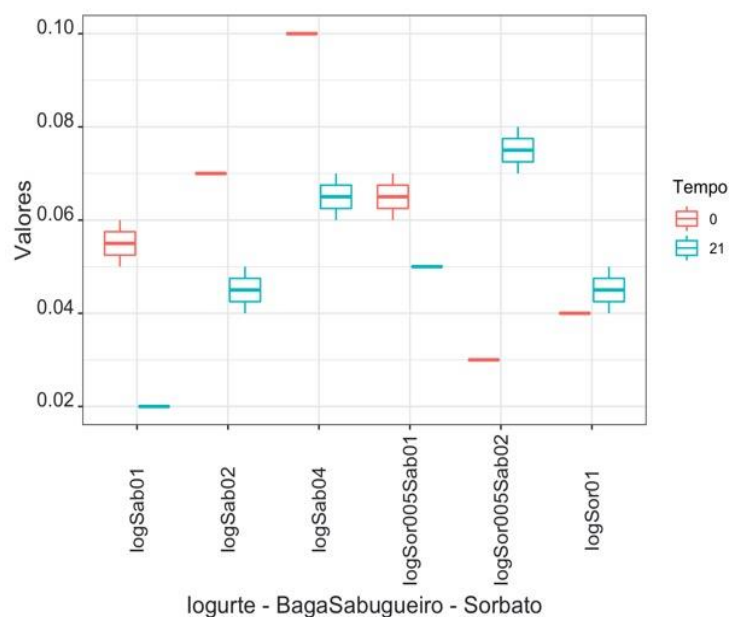
Constata-se ainda que, para este parâmetro os valores do controlo nos dois tempos em estudo foram superiores aos obtidos na amostra 1 (iogurte com 0,1% de extrato). No que diz respeito aos iogurtes em que foi utilizada a mistura não se observaram diferenças significativas entre a formulação, sorbato 0,05+0,1% de BS, no entanto a amostra 5 aos 21 dias de armazenamento diferiu significativamente da amostra 6 e 4. O elevado valor obtido na amostra 5 poderá ser justificado pela enorme dificuldade que tivemos na homogeneização do iogurte com os extratos.

O teor em fenóis totais do controlo situou-se entre os valores quantificados na amostra 1 e 2, no entanto, a quantidade deste parâmetro na amostra 3 foi muito mais elevada do que a do controlo em ambos os tempos em estudo.

Os resultados obtidos para os fenóis totais sugerem que as bagas de sabugueiro podem vir a substituir totalmente o aditivo sintético, sendo que concentrações superiores a 0,2% contribuíram significativamente para o aumento deste composto bioativo do iogurte.

Verificou-se ainda que, a mistura do sorbato com o extrato de BS constitui também uma alternativa promissora no enriquecimento do iogurte em compostos bioativos.

**Flavonoides totais.** A Figura 21 mostra, na forma de boxplot, os dados dos flavonoides para os ensaios de mistura do composto sorbato e/ou EBS no iogurte, salientando-se com diferentes cores os dois tempos de ensaio: 0 e 21 dias.



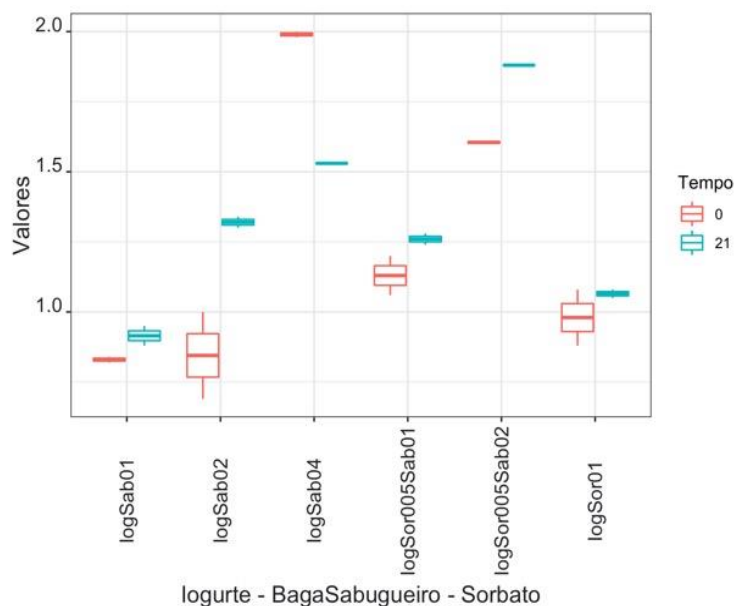
**Figura 21-** Boxplot dos dados dos flavonoides totais associados aos resultados da ANOVA 2 fatores.

Na Tabela 4 e na Figura 21, observou-se que o teor em flavonoides totais oscilou entre  $0,020 \pm 0,000$  e  $0,098 \pm 0,002$  mg eq Q/g de amostra, na amostra 1 (T21) e 3 (T0) respetivamente.

Da análise da Figura 21 constata-se que, quer no T0 quer no T21, o teor em flavonoides totais aumentou à medida que se adicionaram concentrações superiores de BS ao iogurte. Nestes produtos verifica-se ainda que o teor de flavonoides no T21 foi inferior ao observado no T0, o que não era espectável, sugerindo que os flavonoides se degradam ao longo do armazenamento. Os valores obtidos no controlo para os dois tempos em estudo apresentaram valores médios compreendidos entre os obtidos no T21 na amostra 1 e o T0 na amostra 2 também podemos observar que o teor em flavonoides da amostra 3 do T21 foi idêntico ao da amostra 4 no T0. Adicionalmente verificou-se uma grande dispersão no teor em flavonoides das nossas amostras, principalmente nos produtos obtidos com a mistura de sorbato e extrato.

A mistura de sorbato e extrato a 0,2% no iogurte pode vir a substituir com sucesso a concentração de aditivo químico estipulada por lei para este produto.

**Atividade antioxidante por DPPH.** A Figura 22 mostra, na forma de boxplot, os dados do DPPH para os ensaios de mistura do composto sorbato e/ou EBS no iogurte, salientando-se com diferentes cores os dois tempos de ensaio: 0 e 21 dias.



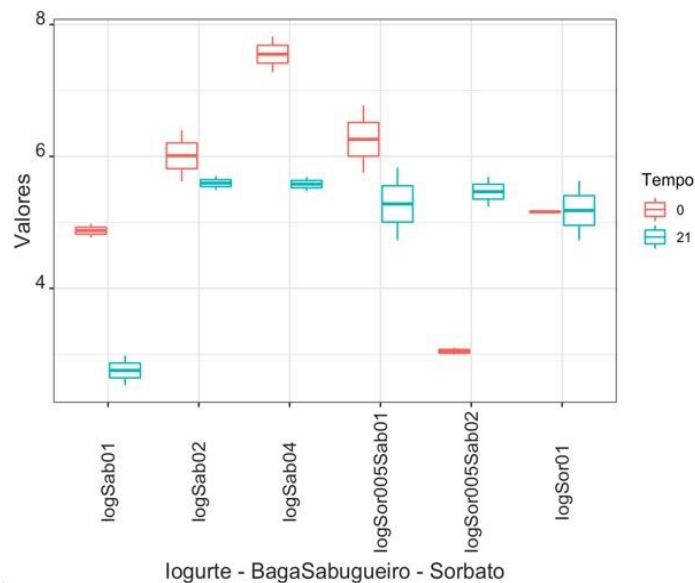
**Figura 22-** Boxplot dos dados do DPPH associados aos resultados da ANOVA 2 fatores.

Na Tabela 4 e na Figura 22, observa-se que o poder antioxidante pelo método do DPPH variou entre  $0,83 \pm 0,01$  e  $1,99 \pm 0,012$  mg Trolox/g de amostra (amostra 1 e 3 do T0).

Da análise da Figura 22 observa-se que nas amostras adicionadas de BS (1, 2 e 3) no T21 se verificou um aumento da atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH. Nas amostras 1 e 2, relativamente ao T0 não se verificaram diferenças significativas, no entanto, na amostra 3 a atividade antioxidante foi a mais elevada de todas as amostras analisadas, para os dois tempos em estudo. A atividade antioxidante do controlo foi semelhante à observada na amostra em que se procedeu à mistura de 0,05% de sorbato e 0,1% de extrato, em ambos os tempos avaliados, porém na amostra 2 esta atividade biológica foi muito superior comparativamente à do controlo.

Os resultados obtidos indicam que para a atividade antioxidante pelo método de DPPH a formulação mais promissora é aquela que contém a mistura de 0,05% de sorbato e 0,2% de BS.

**Atividade antioxidante por FRAP.** A Figura 23 mostra, na forma de boxplot, os dados do FRAP para os ensaios de mistura do composto sorbato e/ou EBS no iogurte, salientando-se com diferentes cores os dois tempos de ensaio: 0 e 21 dias.



**Figura 23-** Boxplot dos dados do FRAP associados aos resultados da ANOVA 2 fatores.

Na Tabela 4 e na Figura 23, observa-se que o poder antioxidante pelo método do FRAP variou entre  $2,76 \pm 0,32$  e  $7,55 \pm 0,38$  mg FeII/g de amostra, respetivamente a amostra 1 (T21) e 3 (T0). Os resultados sumariados na Figura 23, indicam que a atividade antioxidante no T21 de todas as amostras analisadas, à exceção da amostra 1, foram muito idênticos.

No que diz respeito ao T0 nos iogurtes adicionados apenas de BS, a atividade antioxidante aumentou linearmente em função da concentração de extrato.

Nas formulações em que se utilizou a mistura (sorbato+extrato) no T0 a variação não foi uniforme.

No controlo não se verificou variação da atividade antioxidante ao longo do tempo.

Os nossos resultados sugerem que os valores médios da atividade antioxidante do controlo e das amostras 2 e 4 foram idênticos, indicando que o BS pode substituir total ou parcialmente o sorbato na produção do iogurte.

Na globalidade, verificou-se que a BS tem propriedades bioativas e conservantes que a valorizam como aditivo natural, podendo substituir o aditivo sintético testado (sorbato de potássio) parcialmente ou totalmente. Vários trabalhos referem as vantagens na atividade antioxidante e no tempo de vida em produtos lácteos suplementados com extratos de plantas. Por exemplo, em iogurtes com extratos hidro-etanólicos de *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus* (O'Sullivan *et al.* 2016) ou com extrato de

água de *Azadirachta indica* (Shori *et al.*, 2011). A comparação com o sorbato de potássio é relevante pois, embora na Comunidade Europeia este composto esteja legalizado na sua utilização em alimentos, nos Estados Unidos da América não está (Mamur *et al.*, 2010). Alguns estudos descrevem este composto como fracos genotóxicos e/ou mutagénicos (Hasegawa *et al.*, 1984, Mpountoukas *et al.*, 2008), enquanto outros referem que isso não é relevante (Sasaki *et al.*, 2002; Ferrand *et al.*, 2000). Neste âmbito, o estudo de aditivos naturais é relevante na substituição de aditivos químicos sintéticos para dar mais confiança aos consumidores sobre a qualidade e segurança dos produtos alimentares. Por isso, as plantas medicinais ricas em compostos fenólicos, antioxidantes naturais, são progressivamente aplicadas na produção de produtos lácteos para retardar a oxidação e melhorar as propriedades nutricionais e terapêuticas (Bertolino *et al.*, 2015). Globalmente, os extratos de plantas de compostos fenólicos podem ser utilizados para controlar a formação excessiva de radicais livres e aumentar a capacidade antioxidante, bem como prolongar a vida útil dos produtos, por terem menos efeitos secundários que os antioxidantes sintéticos que apresentam efeitos secundários como danos hepáticos e carcinogénicos (Meenakshi *et al.*, 2009).

### 3.4 Avaliação microbiológica dos iogurtes

Os resultados a seguir apresentados referem-se ao estudo comparativo de iogurtes com 2 níveis de concentração de extrato de BS (0,1; 0,2%), com um nível de sorbato de potássio (0,1%) e mistura de sorbato de potássio (0,05%) com extrato de BS (0,1%). O objetivo foi comparar os ensaios com extrato de BS e mistura de sorbato e extrato de BS com o ensaio contendo somente o sorbato. Ou seja, se a adição de extrato de BS ou mistura de sorbato com extrato de BS permitia ter os mesmos resultados de conservação. Para isto, todos os iogurtes preparados foram analisados em dois tempos (0 e 21 dias), em vários parâmetros de qualidade microbiológica (Tabela 6).

**Tabela 6-** Parâmetros microbiológicos dos iogurtes.

Tempo (dias)	Amostra	Mesófilos totais (UFC/mL)	Psicrófilos (UFC/mL)	Bolores e Leveduras (UFC/mL)	Coliformes totais (UFC/mL)	<i>E. Coli</i> (UFC/mL)	<i>S.aureus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i>
0	0,1% Sorbato	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	0,1 Extrato de BS	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	0,2 Extrato de BS	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	0,05% Sorbato+0,1% Extrato de BS	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
7	0,1% Sorbato	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	0,1 Extrato de BS	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	0,2 Extrato de BS	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	0,05% Sorbato+0,1% Extrato de BS	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente

**Tabela 7-** Parâmetros microbiológicos dos iogurtes (continuação).

<b>14</b>	<b>0,1% Sorbato</b>	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	<b>0,1 Extrato de BS</b>	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	<b>0,2 Extrato de BS</b>	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	<b>0,05% Sorbato+0,1% Extrato de BS</b>	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
<b>21</b>	<b>0,1% Sorbato</b>	1,00E+02	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	<b>0,1 Extrato de BS</b>	<10	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	<b>0,2 Extrato de BS</b>	3,57E+02	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente
	<b>0,05% Sorbato+0,1% Extrato de BS</b>	2,00E+02	<10	<10	<1	<1	Ausente	Ausente

Pode-se constatar que o produto formulado apresentou adequados parâmetros de qualidade microbiológica indicando que o produto foi formulado seguindo condições de higiene e segurança alimentar adequados segundo o Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005.

Tendo-se verificado no tempo de 21 dias, um crescimento mínimo de microrganismos mesófilos na amostra de 0,1% de sorbato (controle), 0,2% extrato de BS e mistura de sorbato + extrato (0,05% de sorbato + 0,1% de extrato de BS).



# CAPÍTULO 4

## 4.1 Conclusão

A baga de sabugueiro é um produto natural que apresenta propriedades bioativas atribuídas à presença de compostos fenólicos, como os flavonoides e os ácidos fenólicos, tornando-se importante o seu estudo com vista à sua introdução na alimentação como alimento funcional.

Da análise do estudo experimental para a otimização da extração dos compostos fenólicos totais da BS centrado em dois fatores (pH e % Etanol), verificou-se o ótimo foi pH 0,9 e 60% de etanol.

Através da análise dos resultados obtidos na determinação dos fenóis totais, podemos averiguar que o iogurte com maior % de EBS (amostra 3) foi aquela que apresentou maior quantidade quer no T0 como no T21. Estes resultados mostram que a adição do EBS ao iogurte aumenta as suas propriedades.

Relativamente aos flavonoides totais a amostra 3 (iogurte com 0,4% EBS) foi a que apresentou maior quantidade de flavonoides no T0, sendo a amostra 5 (0,05% sorbato+0,2% EBS) a que indicou o teor mais elevado (T21).

Na atividade antioxidante pelo método DPPH os resultados mostram o que já se descreveu para os flavonoides totais, em que a amostra 3 é aquela que apresenta uma maior atividade no T0 e a 5 no T21.

Quanto à atividade antioxidante determinada pelo método FRAP os resultados sugerem uma vez mais que a amostra 3 é aquela que continua a ter maior atividade antioxidante no T0, relativamente ao T21 as amostras 2,3 e 5 apresentam valores idênticos.

As análises microbiológicas indicaram níveis microbiológicos satisfatórios quer no que diz respeito aos parâmetros de qualidade comercial (microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos, bolores e leveduras), quer no que respeita à qualidade sanitária (coliformes totais) e segurança alimentar (*Salmonella* e *Staphylococcus aureus*). A ausência de *E.coli*, coliformes totais e *Salmonella* spp, evidenciaram que este tipo de produto é seguro para os consumidores.

Com os resultados preliminares deste estudo, podemos concluir que a baga de sabugueiro é um bom aditivo natural e pode substituir totalmente e sobretudo parcialmente o aditivo sintético, sorbato, no iogurte quer como conservante quer como composto bioativo.

**Perspetivas Futuras:**

- ✓ Efetuar a análise sensorial com um painel de consumidores;
- ✓ Avaliar parâmetros físico-químicos (pH, gordura e proteína);
- ✓ Efetuar análises ao iogurte com maior vida de prateleira;

## **5. Referências**

- Abe LT, Da Mota RV, Lajoa FM, Genovese MI. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinífera L.* Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira, 2009.
- Alberti A. Compostos fenólicos da maçã: extração, perfil e classes fenólicas, atividade antioxidante, processamento e avaliação termo analítica. Tese apresentada ao programa de pós-graduação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- Albuquerque WV, Silva EF, Sampaio C. Verificação de características físico-químicas, fungos filamentosos e leveduras em iogurtes comercializados em Maceió, AL. Ciências Agrárias, v.1, n.1, 80-87, 2013.
- Almeida RB, Camarato JL, Navarro DF, Parker YK, Ikegaki, M, Junior VAK. Determinação de flavonoides totais em amostras de própolis. Ciências Biológicas e da Saúde 3, 33-41, 1997.
- Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299, 152-178.
- Andrade KJS, Denadai M, Oliveira MK, Nunes M L, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. Food Research International, 101, 129-138, 2017.
- Apak R, S Gorinstein, V Böhm, KM Schaich, M Özyürek K Güçlü. "Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/activity (IUPAC Technical Report)\*." Pure Appl. Chem 85 (5):957-98, 2013.
- Arcuri EF, Brito MAVP, Brito JRF, Pinto SM, Ângelo FF, Souza GN. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 58(3), 2006.
- ASAE. Segurança Alimentar - Aditivos Alimentares, 2013.
- Aun MV, Mafra C, Philippi JC, Kalil J, Agondi RC, Motta AA. Aditivos em alimentos. Rev. bras. alerg. imunopatol 34 (5). 177-186, 2011.
- Baines, D. Defining the term "natural" in the context of food products. In: Baines, D., Seal, R Natural food additives, ingredients and flavouring. Cambrigde, UK: Woodhead Publishing, 1-21, 2010.

- Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016, Instituto Nacional Estatística, I.P. Portugal, 2017.
- Banwart GJ. Basic Food Microbiology. Estados Unidos da América: Van Nostrand Reinhold, 2ed, 773, 1989.
- Barros L, L Cabrita, MV Boas, AM Carvalho, ICFR Ferreira. “Chemical, Biochemical and Electrochemical Assays to Evaluate Phytochemicals and Antioxidant Activity of Wild Plants.” Food Chemistry 127 (4):1600–1608, 2011.
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. European Food Research and Technology, Berlin, v. 219, 561–571, 2004.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. Verlag Berlin Heidelberg: Springer. 429-466, 2009.
- Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. Talanta 72, 1157-1165, 2007.
- Bertolino M, Belviso S, Dal Bello B, Ghirardello D, Giordano M, Rolle L, Gerbi V, Zeppa G, Influence of the addition of different hazelnut skins on the physicochemical, antioxidant, polyphenol and sensory properties of yogurt, LWT – Food Sci Technol. 63, 1145-1154, 2015.
- Bobbio PA, Bobbio FO. Química do processamento de alimentos. São Paulo: Varela, 2001.
- Brandão SCC. Tecnologia da produção industrial de iogurte. Leite & Derivados, v.4, n.25, 24-38, 1995.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional significance. Nutrition Reviews, v.56, n.11, 317-333, 1998.
- Bruschi V, Shershneva K, Dolgoplova I, Canavari M, Teuber R. Consumer Perceptions of Organic Food in Emerging Markets: Evidence from Saint Petersburg, Russia. V.3, 414-432, 2015.
- Buchweitz M, J Brauch, R Carle DR Kammerer. “Application of Ferric Anthocyanin Chelates as Natural Blue Food Colorants in Polysaccharide and Gelatin Based Gels.” Food Research International 51 (1):274–82, 2013.
- Bylund, G. Dairy processing handbook. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995.

- Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* 32, 1523-1527, 2009.
- Carocho M, Barreiro MF, Morales P, Ferreira ICFR. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377-399, 2014.
- Carocho M, Ferreira ICFRA. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, v.51, 15-25, 2013.
- Carocho M, P Morales, ICFR Ferreira. “Natural Food Additives: Quo Vadis?” *Trends in Food Science and Technology* 45 (2), 2015.
- Cerdeira AMC. Efeito de factores microclimáticos e de fertilidade do solo nos teores fenólicos e de pigmentos do sabugueiro (*Sambucus nigra L.*), Tese de Mestrado em Engenharia Florestal, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2010.
- Chandan, Ramesh. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006.
- Codex Alimentarius: International Food Standards, Commission, General Standard for Food Additives, Codex Stan 192, 1995.
- Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Franco SL, Zeoula LM, Visentainer JV. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 929-935, 2011.
- Cunha AP. *Plantas E Produtos Vegetais Em Cosmética E Dermatologia*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2011.
- Danone é a marca de iogurtes preferida dos portugueses, página da internet: <https://marketeer.sapo.pt/danone-e-a-marca-de-iogurtes-preferida-dos-portugueses> (consultada em Novembro, 2020).
- Das K, Choudhary R, Thompson-Witrick KA. Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 108, 69-80, 2019.
- Desmarchelier PM, Higgs GM, Mills I, Sullivan AM. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. *Food science australia*, v.47, 221-229, 1999.

- Diviš P, J Pořízka, M Vespalcová, A Matějček, J Kaplan. “Elemental Composition of Fruits from Different Black Elder (*Sambucus Nigra* L.) Cultivars Grown in the Czech Republic.” *Journal of Elementology* 20 (3):549–57, 2015.
- Doyle MP. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, 1989.
- Dreosti IE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition*, n.692, 7-8, 2000.
- Dudonné S. “Comprehensive Analysis of Phenolic Compounds and Abscisic Acid Profiles of Twelve Native Canadian Berries.” *Journal of Food Composition and Analysis* 44:214–24, 2015.
- Duymuş HG, F Göger KHC Başer. “In Vitro Antioxidant Properties and Anthocyanin Compositions of Elderberry Extracts.” *Food Chemistry* 155:112–19, 2014.
- Early Ralph. *Tecnologia de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia, 459, 2000.
- FAO. FAOSTAT Metadata / Production. Obtido em 5 de setembro de 2015, 2015.
- FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission Procedural Manual nineteenth edition. Food and Agricultural Organization/ World Health Organization (FAO/WHO), 2010.
- Feng P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: Food and drug administration. *Bacteriological analytical manual*, 1995.
- Fernandes EN *et al.* Qualidade físico-química de iogurtes comercializados em Viçosa (MG). *Anais V Simpoc*, v.5, n.1, 511-524, 2013.
- Ferrand C, Marc F, Fritsch P, Cassand P, Saint DE, Blanguat G, Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food condition, *Aminoacids*, 18, 251-263, 2000.
- Ferrandin G. Avaliação do potencial antioxidante e produção de fermentado alcoólico a partir do bagaço de maçã. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.
- Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J.Biol.Chem*; 73: 627-50, 1927.
- Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*, Artmed Editora, Porto Alegre, 424, 2002.
- Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia de alimentos*. São Paulo: Athenea, 182, 1996.
- Funari CS, Ferro VO. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas 26, 171-178, 2006.
- Galdino PO, Galdino PO, Fernandes TKDS, Oliveira MRTD, Rocha APT. Caracterização sensorial de iogurte enriquecido com polpa da palma forrageira (Napolea

- cochenillifera). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 5, n. 5, 2010.
- Giese S, Coelho SRM, Téó CRPA, Nóbrega LHP, Christ D. Caracterização físico-química e sensorial de iogurtes comercializados na região oeste do Paraná. *Revista Varia Scientia Agrárias*, vol. 01, n. 01, 121-129, 2010.
- Hasegawa M, Nishi Y, Ohkawa Y, Inui N, Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured Chinese Hamster cells, *Food and Chemical Toxicology*, 22, 505-507, 1984.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull*; 36: 2090-2097, 1988.
- Hubbert W, Hagstad H, Spangler E, Hinton M, Hughes K. Food safety and quality assurance: foods of animal origin. Second Edition. Iowa: Iowa State University Press, 1996.
- ICMSF. Microorganisms in foods. Microbiological specifications of food pathogens. Great Britain: International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies. 513, 1996.
- ICMSF-International commission on microbiological specification for foods. Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia, 431, 1984.
- Khan IA, Abourashed EA. *Leung's Encyclopedia Of Common Natural Ingredients*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. pxxvii-xxix, 2010.
- Koss-Mikołajczyk, I, A Lewandowska, T Pilipczuk, B Kusznierevicz, A Bartoszek. "Composition of Bioactive Secondary Metabolites and Mutagenicity of *Sambucus Nigra* L. Fruit at Different Stages of Ripeness." *Acta Alimentaria* 45 (3):443–52, 2016.
- Lee J, CE Finn. "Anthocyanins and Other Polyphenolics in American Elderberry (*Sambucus Canadensis*) and European Elderberry (*S. Nigra*) Cultivars." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (14):2665–75, 2007.
- Loures MMR, Minim VPR, Ceresino EB, Carneiro RC, Minim LA. Análise descritiva por ordenação na caracterização sensorial de iogurte diet sabor morango enriquecido com concentrado protéico de soro. *Ciências Agrárias, Londrina*, v.31, n.3, 661-668, 2010.
- Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S, Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?, *Toxicology in Vitro* 24 (3), 790-794, 2020

- Março PH, Poppi RJ, Scarminio IS. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, v.31, n.5, 1218-1223, 2008.
- Martins N, Petropoulos S, Ferreira ICFR. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium Sativum L.*) as affected by pre- and post- Harvest conditions: A review. *Food chemistry*, v.211, 41-50, 2016.
- Medeiros TC, Moura AS, Araújo KB, Aquino LCL. Elaboração de iogurte de jaca: Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial. *Scientia Plena*, v. 7, n. 9, 1-4, 2011.
- Mesquita RVSC, Figueiredo Neto A, Teixeira F, Silva VO. Elaboração, análise físico-química e aceitação do iogurte com adição do tamarindo “doce” (*Tamarindus indica L.*). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 14, 381- 387, 2012.
- Miele *et al.* A mixture of 3 Bifidobacteria decreases abdominal pain and improves the quality of life in children with irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.51, n.1, 5-10(6), 2017.
- Mikulic-Petkovsek M, Samoticha J, Eler K, Stampar F, Veberic R. Traditional Elderflower Beverages: A Rich Source of Phenolic Compounds with High Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 1477–1487, 2015.
- Mikulic-Petkovsek M, V Schmitzer, A Slatnar, B Todorovic, R Veberic, F Stampar, A Ivancic. 2014. “Investigation of Anthocyanin Profile of Four Elderberry Species and Interspecific Hybrids.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (24):5573–80,2014.
- Mladenka P, M Ríha, J Martin, B Gorová, A Matejíček. “Fruit Extracts of 10 Varieties of Elderberry (*Sambucus Nigra L.*) Interact Differently with Iron and Copper.” *Phytochemistry Letters* 18:232–38, 2016.
- Mossel D, Garcia B. *Microbiologia de los alimentos. Fundamentos ecologicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos.* Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 375, 1985.
- Mpountoukas P, Vantarakis A, Sivridis E, Lialiaris T, Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2390-2393, 2008.
- Nowak D, M Goslinski, A Szwengiel. “Multidimensional Comparative Analysis of Phenolic Compounds in Organic Juices with High Antioxidant Capacity.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016.

- NP 2307. Regras gerais para a contagem de microrganismos psicotróficos, 1987.
- NP 4405. Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C, 2002.
- NP-2077. Carnes, derivados e produtos cárneos. Contagem de bolores e leveduras. Método de referência. Lisboa: IPQ, 1985.
- NP-4400-1 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (método corrente). IPQ, Portugal, 2002.
- Oliveira FM, Lyra IN, Esteves GSG. Avaliação Microbiológica, Físico-Químico de Iogurtes de Morango Industrializados e Comercializados no Município de Linhares, 2014.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida La Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 2011.
- Paula, V. B., Estevinho, L. M., & Dias, L. G. Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 569–580, 2017.
- Peres F, Polônio MLT. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. In: *Cad. Saúde Pública*. v.25, n.8, 1653- 1666, 2009.
- Pisoschi AM, A Pop. “The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55–74, 2005.
- Pokorný J. Preparation of Natural Antioxidants. In: Pokorný, J., Yanishlieva, N., Gordon M. *Antioxidants in food*. England: CRC Press. 311-327, 2001.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3396-3402, 2000.
- Quílez J, JA Ruiz, G Brufau, M Rafecas. “Bakery Products Enriched with Phytosterols,  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -Carotene. Sensory Evaluation and Chemical Comparison with Market Products.” *Food Chemistry* 94 (3):399–405, 2006.
- Quintino SS. Avaliação comparativa de iogurte produzido a partir da polpa natural de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) e suco artificial. *Enciclopédia Biosfera*, v.8, n.14, 1.831, 2012.

- Ramírez-Sucre MO, Vélez-Ruiz JF. Physicochemical, rheological and stability characterization of a caramel flavored yogurt. *LWT- Food Science and Technology*, Amsterdam v.51, 233-241, 2013.
- Ramos *et al.* Vida de prateleira de iogurte de cajá com *Bacillus clausii*: avaliação química, físico-química e microbiológica. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.13, n.4, 2019.
- Ray B. *Fundamental food microbiology*. Boca raton: CRC Press, 519, 1996
- Regulamento (CE) N° 1334/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008.
- Regulamento (CE) N° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo aos Aditivos Alimentares, 16-33, *Jornal Oficial da União Europeia*, 31 de dezembro de 2018.
- Reinoso E, El-Sayed A, Lammler C, Bogni C, Zschock M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research* 163, 314—322, 2008.
- Robinson RK. *Dairy Microbiology Handbook*. New York: John Wiley and Sons, 2000.
- Rocha C *et al.* Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutas do cerrado. *Boletim CEPPA*, v. 26, n. 2, 255-266, 2008.
- Rodas MA de B. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 3, 304-309, 2001.
- Sá P. *et al.* Processamento do Iogurte Gordo Sólido. *Escola Superior Agrária De Coimbra*. Coimbra, 155, 2007.
- Sales NFF, Cruz APG, Cabral LMC, Torres AG. Capacidade antioxidante de extratos hidro alcóolicos do bagaço de uva tinta. *Xix Congresso Brasileiro de Engenharia química*. Búzios, 2012.
- Sánchez-Morenos C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. *Actividad antioxidante*. *Alimentaria*, v. 329, 29-40, 2002.
- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutation Research*, 519, 103-119, 2002.
- Schmidt, Carla Adriana Pizarro *et al.* Formulação e avaliação sensorial hedônica de iogurte com polpa de acerola. *Revista Científica Inovação e Tecnologia*, Medianeira, v. 1, n. 5, 10-14, 2012.

- Scopeli M, E Nunes, M Vignoli-Silva, GS Vendruscolo, Amélia T Henriques, Lilian A Mentz. “(Caprifoliaceae) Utilizadas Como Medicinais No Brasil.” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n. 17, 2007.
- Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. “Processed Elderberry (*Sambucus Nigra* L.) Products: A Beneficial or Harmful Food Alternative?” *LWT - Food Science and Technology* 72:182–88, 2016.
- Silva Jr EA, Martins EA. *Análise microbiológica em cozinhas industriais. Higiene Alimentar*. São Paulo. v.5, n. 17, 20-24, 1991.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 259, 1997.
- Silva P, Ferreira S, Nunes MF, Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins and antioxidant polyphenols, *Industrial Crops and Products*, 95, 227-234, 2017.
- Silva PS, Gandra EA. *Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos*. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.18, n. 122, 32-40, 2004.
- Silva R, *Propriedades corantes e bioativas de sumo de sabugueiro: aplicação alimentar e estabilidade cromática*, Tese de Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais, Instituto Politécnico de Bragança em cooperação com a Universidade de Salamanca, 2017.
- Silva WP. *Caracterização fenotípica de cepas de S. aureus isolados de leite de vacas com mastite subclínica e de outros produtos de leite*. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1998.
- Simões DMM, *Caraterização físico-química de polpas de fruta com vista à otimização industrial de processos enzimáticos*. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Ramo Alimentar, Universidade de Aveiro, 2015.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin– Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178, 1999.
- Siqueira RS. *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasilia: Embrapa, SPI; Rio de Janeiro: Embrapta, CTAA, 159, 1995.
- Smeriglio A, D Barreca, E Bellocco, D Trombetta. “Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins.” *Phytotherapy Research*, 2016.

- Soares M, Welter L, Kuskoski EM, Gonzaga L, Fett R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.30 n.1 Jaboticabal Mar. 2008
- Soares. Ácidos fenólicos como antioxidante, *Revista de Nutrição*, 15 (1): 71-81, jan./abr., 2002.
- Sousa A, Ferreira ICFR, Barros L, Bento A, Pereira JA. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”. *Food Science and Technology* 41, 739-745, 2008.
- Sousa *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, v.30, n.2, 351-355, 2007.
- Souza G. Fatores de qualidade de iogurte. *Coletânea do ITAL*, v. 21, n.1, 20-27, 1991.
- Szalóki-Dorkó L, M Stéger-Máté, L Abrankó. “Effects of Fruit Juice Concentrate Production on Individual Anthocyanin Species in Elderberry.” *International Journal of Food Science and Technology* 51 (3):641–48, 2016.
- Tamime AY. *Fermented milks*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2006.
- Teixeira ACP, Mourthé K, Alexandre DP, Souza MR, Penna CFAM. Qualidade do Iogurte Comercializado em Belo Horizonte. *Leite & Derivados*, v. 1, n. 51, 32-39, 2000.
- Tetra Pak Dairy Index. Consumo global de lácteos deve crescer 36% até 2024, 2014. Disponível em: <http://www.tetrapak.com/br/about/newsarchive/tetra-pak-dairy-indexrising-global-demand-requires-careful-balancing-act>.
- Tronco VM. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997.
- Ulbricht C, Basch E, Cheung L, Goldberg H, Hammerness P, Isaac R, Khalsa SPK, Romm A, Rychlik I, Varghese M, Weissner W, Windsor CR, Wortley J. An Evidence-Based Systematic Review of Elderberry and Elderflower (*Sambucus nigra*) by the Natural Standard Research Collaboration, *Journal of Dietary Supplements*, 11(1), 80-120, 2014.
- Vlachoianis C, BF Zimmermann, S Chrubasik-Hausmann. “Quantification of Anthocyanins in Elderberry and Chokeberry Dietary Supplements.” *Phytotherapy Research* 29 (4):561–65, 2015.
- Vlachoianis JE, M Cameron, S Chrubasik. “A Systematic Review on the Sambuci Fructus Effect and Efficacy Profiles.” *Phytotherapy Research*, 2010.

- Volp ACP, Renhe IRT, Barra K, Stringueta PS. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v.23, n.2, 141-149, 2008.
- Zaffino C, S Bruni, B Russo, R Pilu, C Lago, GM Colonna. "Identification of Anthocyanins in Plant Sources and Textiles by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)." *Journal of Raman Spectroscopy* 47 (3):269–76, 2016.
- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.
- Zicker MC. Obtenção e utilização do extrato aquoso de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg) em leite fermentado: I. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- Zishen J., Mengcheng T., Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*64, 555-559, 1999.
- Meenakshi S, Gnanambigai DM, Mozhi ST, Arumugam M, Balasubramanian T, Total flavanoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast, *Global. J. Pharmacol.* 3 (2), 59-62, 2009.
- O'Sullivan AM, O'Grady MN, O'Callaghan YC, Smyth TJ, O'Brien NM, Kerrya JP, Seaweed extracts as potential functional ingredients in yogurt, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 37, 293–299, 2016.
- Shori AB, Baba AS, Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by *Azadirachta indica*-yogurt, *J. Saudi Chem. Soc.*, 17, 295-301, 2011.