

Utilização de polpa de tramazeira (*Sorbus aucuparia*) como conservante em iogurte natural

Gabriela Valentina Pino Vergara

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR/CM)

Orientado por

Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

Professora Doutora Roberta de Souza Leone

Bragança

2024

Agradecimentos

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, cujo apoio, fortaleza e encorajamento foram fundamentais para minha jornada até este ponto.

Manifesto meu sincero apreço aos meus pais, cuja generosidade e encorajamento foram pilares essenciais ao longo dos anos dedicados aos estudos.

Expresso minha gratidão à Professora Doutora Letícia Estevinho, minha orientadora, pela concessão da oportunidade de conduzir esta pesquisa, pela valiosa troca de conhecimentos, pela constante disponibilidade e pelo apoio integral oferecido durante o processo de elaboração deste trabalho acadêmico.

Da mesma forma, manifesto meu apreço ao Professor Doutor Luís Dias pela sua generosa disponibilidade, palavras estimulantes, compartilhamento de conhecimentos e pelo sólido apoio e amizade oferecidos ao longo desta jornada acadêmica.

Agradeço igualmente à Mestra Vanessa Marina Branco Paula, pela sua constante disponibilidade, apoio e orientação ao longo de todo o processo, assim como pela transmissão de conhecimentos e paciência demonstrada.

Às minhas colegas de laboratório, Natália Seixas, Lais Sene, Hellen Rodrigues, Diana Paulo e Alexandra Teixeira, expresso minha gratidão pela colaboração e orientação fornecidas durante a elaboração desta dissertação.

Não posso deixar de mencionar a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade concedida de realizar o mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar no Instituto Politécnico de Bragança.

A todos os amigos e familiares que, embora não citados nominalmente, estiveram presentes ao longo desta jornada acadêmica, fornecendo apoio, incentivo e celebrando minhas conquistas, expresso minha profunda gratidão.

Por fim, expresso minha sincera gratidão a todos que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de Tabelas	vi
Índice de Equações	vi
Lista de abreviaturas	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
ENQUADRAMENTO	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Iogurte	1
1.1.1. Mercado e consumidores.....	1
1.1.2. Principal matéria-prima utilizada na produção do iogurte.....	3
1.1.3. Produção do iogurte	5
1.1.4. Composição química e nutricional.....	8
1.1.5. Benefícios para a saúde resultantes do consumo de iogurte	10
1.1.6. Culturas lácticas	11
1.1.7. Aditivos	12
1.1.8. Probiótico	15
1.2. A árvore Tramazeira	16
1.2.1. Caracterização e distribuição da Tramazeira	16
1.2.2. Caracterização bioquímica	18
1.2.3. Compostos fenólicos	19
1.2.5. Atividades biológicas	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26

2.1. Amostragem de frutas de Tramazeira	26
2.2. Otimização do extrato hidro-etanólico das frutas	26
2.3. Análise de compostos fenólicos e atividade biológica.....	28
2.4. Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	31
2.5. Análise de extrato por cromatografia em camada fina (TLC)	31
2.6. Preparação do iogurte.....	32
2.7. Análises microbiológicas no iogurte.....	35
2.8. Análises físico-químicas no iogurte	41
2.9. Aceitação sensorial e intenção de compra	43
2.10. Tratamento estatístico	44
3. RESULTADO E DISCUSSÕES	46
3.1. Análise de açúcares por HPLC	46
3.2. Amostras da fruta da Tramazeira	48
3.3. Otimização do extrator hidro-etanólico	49
3.4. Análise por cromatografia em camada fina (TLC)	52
3.5. Análises no iogurte.....	53
3.5.1. Análises físico-químicas	53
3.5.2. Composição fenólica e atividades biológicas	55
3.5.3. Análises microbiológicas	59
3.5.4. Análise sensorial	64
4. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS	71

Índice de figuras

Figura 1: Fluxograma do processo de fabrico do iogurte sólido, batido e líquido.....	6
Figura 2: Fruto da árvore Tramazeira.....	17
Figura 3: Zonas de cultivo de Tramazeira em Portugal.	18
Figura 4: Principais classes de fitoquímicos naturais.....	20
Figura 5: Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos.....	22
Figura 6: Estruturas químicas dos principais ácidos hidroxibenzóicos.....	22
Figura 7: Fruto, polpa e polpa liofilizada de Tramazeira.	26
Figura 8: Variáveis de resposta.	27
Figura 9: Fluxograma da metodologia da obtenção de iogurte enriquecido em polpa.	33
Figura 10: Produção do iogurte	34
Figura 11: Adição da polpa de morango no iogurte.....	35
Figura 12: Solução de ringer, solução mãe 10^0	36
Figura 13: Análise de Bolores e Leveduras.....	37
Figura 14: Análise de Escherichia coli/ Coliformes Totais.....	38
Figura 15: Análise de Staphylococcus aureus.	39
Figura 16: Análise de Mesófilos Totais.....	40
Figura 17: Análise de Bactérias Lácticas.	41
Figura 18: Medidor de aw (Aqualab 4TE Decagon, USA) utilizado.....	42
Figura 19: a preparação dos extratos de iogurte.....	43
Figura 20: Exemplo do cromatograma obtido da análise de uma solução padrão de mistura dos 4 açucares.....	46
Figura 21: Calibração da glucose por HPLC.....	48
Figura 23: Modelos de RSM (Resposta de Superfície de Resposta).....	52
Figura 24: Leitura da placa de TLC.	53
Figura 25: Anova FRAP.....	56
Figura 26: Anova DPPH.....	56
Figura 27: Anova FLAV	57
Figura 28: Anova TPC	57

Figura 29: Efeitos dos fatores concentração de extrato no iogurte e tempo de ensaio no crescimento das bactérias lácticas.	62
Figura 30: Efeitos dos fatores concentração de extrato no iogurte e tempo de ensaio no crescimento dos mesófilos.....	63
Figura 31: Gráfico circular de gênero dos participantes.	64
Figura 32: Gráfico circular do nível de escolaridade.	65
Figura 33: Gráfico de barras do parâmetro aparência do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.	65
Figura 34: Gráfico de barras do parâmetro aroma do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.....	66
Figura 35: Gráfico de barras do parâmetro sabor do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.....	66
Figura 36: Gráfico de barras do parâmetro consistência do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.	67
Figura 37: Gráfico circular em relação a aceitabilidade de compra, sendo amostra 123 adicionado de extrato e a amostra 456 acrescentada de sorbato de potássio.....	67
Figura 38: Gráfico circular em relação ao poder de compra, sendo amostra 123 adicionado de extrato e a amostra 456 acrescentada de sorbato de potássio.....	68

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição nutricional do leite e do iogurte natural meio gordo.....	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 2: Classe de compostos fenólicos em plantas.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4: Desenho experimental para otimização do extrator hidro-etanólico	28
Tabela 5: Parâmetros das calibrações por HPLC	47
Tabela 6: desenho experimental de otimização da solução extratora hidro-etanólica.	50
Tabela 7: Resultados das análises físico-químicas do iogurte.....	53
Tabela 8: Resultados da ANOVA para as análises químicas.	55
Tabela 9: Bolores e leveduras, Bactérias lácticas, Escherichia coli/Coliformes totais e Estafilococos coagulase-positiva em durante armazenamento a 4°C por 14 dias.....	60
Tabela 10: Resultados da ANOVA (valores de p) para as análises microbiológicas: bactérias lácticas e mesófilos totais.	61

Índice de Equações

Equação 1: Efeito de bloqueio.....	29
Equação 2: Contagem de colónias de Estafilococos coagulase positiva.	39
Equação 3: Contagem de Microrganismos de cada amostra	41
Equação 4: Índice de aceitabilidade (IA)	44

Lista de abreviaturas

% (v/v) - Percentagem em Volume/Volume
AG - Ácido gálico
ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
Aw – Atividade da água
BHA - Butil-hidroxianisol
BHT - Hidroxitolueno
CE - Comunidade Europeia
DPPH - 2,2 difenil-picrilhidrazil
ESA - Escola superior agrária
FAO - Organização para Alimentação e Agricultura
FRAP - Método Redução de Ferro
g - Gramas
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
IC - Iogurte convencional
IMC - Índice de massa corporal
INE - Instituto Nacional de Estatística
LAB - Bactérias ácido lácticas
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
mg- Miligrama
mL - Mililitro
NP - Norma Portuguesa
OH - Hidróxilo
OMS - Organização Mundial de Saúde
PIQ - Padrões de identidade e qualidade
Q - Quercetina
TLC - Cromatografia em camada fina
UE - União Europeia
UFC - Unidades Formadoras de Colónias
UHT - Ultrapasteurização

RESUMO

O fruto da tramazeira é um recurso natural que possui propriedades bioativas graças à presença de compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos. Investigar este fruto é importante para potencialmente incorporá-lo na alimentação como uma alternativa natural aos conservantes químicos amplamente usados nos alimentos comercializados globalmente. A polpa da tramazeira, devido à presença de substâncias como sorbitol e ácido sórbico, poderá substituir aditivos químicos atualmente usados na conservação de iogurtes. Este enfoque está alinhado com a demanda crescente por produtos alimentares mais naturais, atrativos e acessíveis economicamente. O estudo atual investigou a otimização da extração de compostos fenólicos e avaliou o efeito da inclusão de extrato de polpa do fruto da tramazeira na formulação de iogurte.

Os resultados da análise incluíram teores de compostos fenólicos totais (TPC), atividades antioxidantes (métodos DPPH e FRAP) e concentrações de açúcares por HPLC, referentes aos 14 ensaios realizados segundo um desenho experimental para a otimização do extrator hidroetanólico. Os níveis médios de compostos fenólicos variaram entre 40 e 65 mg/g de polpa liofilizada, com uma média de 56 mg/g. A atividade antioxidante média foi de 83% pelo método DPPH e 0,43 mg FeCl₃/g de polpa liofilizada pelo método FRAP. O sorbitol foi encontrado em concentrações superiores à frutose, sendo a glucose, o açúcar menos abundante (concentração média de 95 g de sorbitol, 27 mg de frutose e 22 mg de glucose por g de polpa liofilizada). A solução ótima de extrato hidroetanólico foi escolhida com pH 4,9 e 40% de etanol, garantindo elevada extração de compostos fenólicos.

Nos iogurtes, os valores de pH não diferiram significativamente entre o controle e os adicionados com extrato. A adição de extrato de tramazeira não afetou a composição físico-química dos iogurtes, mantendo-os dentro dos padrões microbiológicos europeus. A análise sensorial dos iogurtes indicou uma aceitação favorável por parte dos consumidores para ambas as amostras, com o iogurte enriquecido com 0,1% de extrato de tramazeira demonstrando médias superiores em aparência, aroma e sabor geral em comparação com o iogurte com sorbato de potássio. No entanto, o iogurte com sorbato de potássio obteve uma classificação superior em consistência.

A análise estatística mostrou resultados significativos para as propriedades químicas, destacando os efeitos do extrato de tramazeira e do tempo de armazenamento nos níveis de antioxidantes e compostos fenólicos.

Conclui-se que o extrato de tramazeira pode ser um aditivo natural promissor em produtos lácteos, apresentando propriedades antioxidantes e conservantes. A aceitação dos iogurtes enriquecidos com extrato indica um potencial para sua aplicação comercial, fornecendo uma alternativa aos aditivos químicos sintéticos e atendendo às expectativas dos consumidores em termos de qualidade e segurança alimentar. Novos estudos são necessários para confirmar esses resultados e explorar ainda mais o potencial do extrato de tramazeira em alimentos.

Palavras-chaves: tramazeira; iogurte; extrato hidroetanólico; aditivos químicos.

ABSTRACT

The fruit of the rowan tree is a natural resource with bioactive properties attributed to the presence of phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids. Investigating this fruit is important to potentially integrate it into diets as a natural alternative to the widely used chemical preservatives in globally marketed foods. Rowan pulp, containing substances like sorbitol and sorbic acid, could replace chemical additives currently used in yogurt preservation. This approach aligns with the increasing demand for more natural, appealing, and economically viable food products. The current study aimed to optimize the extraction of phenolic compounds and to evaluate the effect of incorporating rowan fruit pulp extract in yogurt formulations.

Analysis results included total phenolic compound (TPC) levels, antioxidant activities (DPPH and FRAP methods), and sugar concentrations by HPLC, from the 14 trials conducted according to an experimental design for hydroethanolic extractor optimization. Average phenolic compound levels ranged from 40 to 65 mg/g of freeze-dried pulp, with a mean of 56 mg/g. The average antioxidant activity was 83% by the DPPH method and 0.43 mg FeCl₃/g of freeze-dried pulp by the FRAP method. Sorbitol was found in higher concentrations than fructose, with glucose being the least abundant sugar (average concentration of 95 g sorbitol, 27 mg fructose, and 22 mg glucose per g of freeze-dried pulp). The optimal hydroethanolic extract solution was chosen with pH 4.9 and 40% ethanol, ensuring high extraction of phenolic compounds.

In the yogurts, pH values did not significantly differ between the control and extract-added samples. The addition of rowan extract did not affect the physicochemical composition of the yogurts, keeping them within European microbiological standards. Sensory analysis of the yogurts indicated favorable acceptance by consumers for both samples, with the yogurt enriched with 0.1% rowan extract showing higher averages in appearance, aroma, and overall taste compared to the yogurt with potassium sorbate. However, the yogurt with potassium sorbate received a higher rating in consistency. Statistical analysis showed significant results for chemical properties, highlighting the effects of rowan extract and storage time on antioxidant levels and phenolic compounds.

It is concluded that rowan extract can be a promising natural additive in dairy products, exhibiting antioxidant and preservative properties. The acceptance of yogurts

enriched with extract indicates commercial potential, providing an alternative to synthetic chemical additives and meeting consumer expectations in terms of quality and food safety. Further studies are needed to confirm these results and further explore the potential of rowan extract in foods.

Keywords: rowan tree; yogurt; hydroethanolic extract; chemical additives.

ENQUADRAMENTO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 20% dos alimentos produzidos perdem-se por deterioração. A preservação dos alimentos pode ser obtida mediante a utilização de alguns processos físicos e biológicos, como refrigeração, secagem e aquecimento. Quando os alimentos não podem ser submetidos a essas técnicas é necessário a utilização de aditivos químicos, os conservantes. De facto, a maioria dos produtos industrializados precisam dos conservantes para aumentar o seu tempo de vida de prateleira, evitando assim a contaminação por microrganismos patogénicos e de deterioração que, poderão danificar o alimento tornando-o impróprio para consumo. Estas substâncias são usadas, principalmente, para manter as características de sabor, consistência e aparência, bem como o valor nutritivo destes produtos.

Atualmente devido aos potenciais riscos toxicológicos decorrentes da ingestão diária de substâncias químicas tem-se aumentado a pesquisa de aditivos naturais que possam vir a ser utilizados para substituir total ou parcialmente os conservantes químicos.

Apesar dos estudos científicos que comprovem os efeitos negativos dos aditivos químicos na saúde Humana serem escassos, alguns investigadores referem que o excesso de ingestão de alimentos com conservantes químicos pode desencadear doenças particularmente alergias e neoplasias.

A nível industrial aumentar o tempo de vida de prateleira de um produto alimentar é crucial pois reduz as perdas de alimentos e resíduos, além de proteger a saúde dos consumidores. Os aditivos alimentares podem prolongar a vida útil, restaurar a cor, melhorar o sabor, a consistência e aparência, bem como o valor nutritivo dos alimentos. Os aditivos alimentares utilizados tradicionalmente na indústria alimentar no controle de alterações em alimentos, vem dando espaço a novos aditivos, apelando pela substituição por aditivos naturais, na industrialização de alimentos.

Geralmente os consumidores preferem alimentos sem aditivos, ou “free” de aditivos/ingredientes artificiais, em decorrência disso surgiu uma nova abordagem na percepção do consumidor sobre produtos alimentícios, o chamado “rótulo limpo”. Isso trouxe novos desafios às indústrias de processamento alimentar, sendo necessário o uso de combinação de novas tecnologias direcionadas á necessidade atual de substituir os conservantes artificiais por naturais e que sejam seguros para o consumidor e atendam aos requisitos de qualidade.

A tramazeira (*Sorbus aucuparia*), árvore indígena, de Portugal cujos produtos estão a ser

subvalorizados/desvalorizados, por apresentar elevados teores de ácidos sorbico, málico, sorbitol, fenóis e vitamina C poderá vir a ser uma ótima alternativa para substituir os aditivos químicos.

É reportado na literatura que é importante extrair os compostos fenólicos dos frutos da Tramazeira, pois estes podem ser utilizados como aditivos naturais, contudo, o processo de extração deve ser aprimorado para que não haja perda dos vários grupos de compostos fenólicos extraídos da polpa do fruto.

Objetivos geral

Este trabalho tem como objetivo global avaliar o efeito da utilização da polpa do fruto da Tramazeira na conservação e bioatividade do iogurte. O estudo envolveu a realização de análises microbiológica, físico-químicas, valor nutricional, compostos biológicos e bioatividade.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Analisar o perfil das bagas da Tramazeira através de análises físico-químicas, determinação da composição fenólica e análises microbiológicas;
- Otimizar o processo de extração da polpa e do iogurte;
- Preparar um iogurte sabor a morango, tipo “batido”, apenas com adição do sorbato de potássio;
- Produzir iogurtes sabor a morango, tipo “batido”, substituindo o conservante convencionalmente utilizado na indústria (sorbato de potássio), total ou parcialmente, pelo extrato de bagas de tramazeira;
- Avaliar o tempo de vida de prateleira dos diferentes tipos de iogurte:
 - i) adicionado de sorbato (controlo);
 - ii) adicionado do extrato de polpa do fruto da tramazeira natural;
- Análise sensorial.

Estrutura do trabalho

O presente trabalho é estruturado em quatro capítulos: O primeiro capítulo, intitulado "Introdução", aborda de maneira abrangente o iogurte, incluindo sua composição e processo de produção, além de fornecer informações sobre a árvore de tramazeira, incluindo sua localização, características bioquímicas e propriedades bioactivas. No segundo capítulo, denominado "Materiais e Métodos", são descritas as metodologias utilizadas para investigar as propriedades do fruto da tramazeira, bem como o processo de produção do iogurte e suas análises, incluindo avaliações sensoriais. O terceiro capítulo, "Resultados e Discussões", apresenta os resultados obtidos no estudo. Por fim, o quarto capítulo, "Conclusão", sintetiza os resultados obtidos no estudo e propõe pesquisas futuras para aprimorar o entendimento dos benefícios da árvore de tramazeira.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Iogurte

O Iogurte é definido na Portaria nº 742/92 de 24 de Julho como “o produto coagulado, obtido por fermentação láctica conduzida por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e do *Streptococcus thermophilus* sobre o leite e produtos lácteos, e com ou sem ingredientes, devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final”. Encontram-se também estabelecidos os limites para os parâmetros microbiológicos: Contagem da Flora Específica do Iogurte (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*); Pesquisa e contagem de Coliformes; Contagem de Bolores e Leveduras e Vitalidade da Flora Específica do Iogurte.

1.1.1. Mercado e consumidores

O mercado global de iogurte está projetado para atingir uma avaliação de US\$ 79.147,2 milhões até 2033, de US\$ 44.808,5 milhões em 2023. Ele deve se expandir rapidamente a um CAGR de 5,9% no período estimado entre 2023 e 2033.

Nos últimos anos tem-se observado um aumento do consumo iogurte. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (Ine, 2019) o consumo anual per capita, em Portugal, de leites acidificados (incluindo iogurtes) aumentou de 2,7 kg em 1983 para 20,2 kg em 2004. No ano de 2018, foi consumido em 96% dos lares portugueses e, apesar de poder ser considerada uma categoria tradicional, está longe de ser desatualizada.

O iogurte deixou de ser apenas dirigido para as crianças e para o lanche (Martins, 2004). Este produto é consumido por um público muito mais diversificado, em várias ocasiões, dentro e fora de casa, como produto final ou até como tempero para saladas ou usado como ingrediente na pastelaria (Impala, 2005). O espaço reservado ao iogurte nas prateleiras dos distribuidores tem aumentado nos últimos anos (Martins, 2004), o que contribui também para demonstrar a consolidada presença do iogurte na vida do consumidor português. O consumidor atualmente está mais sensibilizado para introduzir hábitos alimentares mais saudáveis na sua rotina do dia-dia, o que o torna cada vez mais exigente e preocupado com a questão da saúde sendo este aspeto relevante na hora da

compra dos mesmos; de fato, os consumidores estão cada vez mais interessados em incorporar alimentos saudáveis na sua dieta (Hekmat & Reid, 2006). Também, a sensibilização crescente dos consumidores para os benefícios do iogurte para a saúde, fez com que os fabricantes atendendo a esta nova demanda, passassem a produzir maior quantidade e diferentes tipos de produtos, o que se traduziu no crescimento do mercado de iogurte.

O iogurte pode ser encontrado em forma líquido-viscoso que é chamado de iogurte batido ou com consistência densa que é o iogurte tradicional. A diferença entre estes é que o iogurte batido sofre agitação lenta após o processo fermentativo (Alvarenga, 1995). Já 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 & Kilara, 2013).

Atualmente, observa-se o aumento da alimentação consciente e, com isso, a participação dos alimentos funcionais no mercado progrediu. Os alimentos funcionais para além de fornecem elementos que vão nutrir os consumidores, também vão melhorar aspetos físicos e comportamentais das pessoas, mediante a modulação de várias funções fisiológicas (Liu et al., 2020). Dessa forma, os probióticos apresentam-se como uma das classes mais rentáveis e em constante crescimento, com uma projeção global de ganhos por volta de 78,3 bilhões de dólares em 2026 para a categoria de alimentos com alegação de propriedade funcional (Dioso et al., 2020; Oliveira et al., 2017). Estima-se que o leite é a matriz alimentar em que os probióticos são mais utilizados no mercado de alimentos (Liu et al., 2020). Devido a sua maior aceitação comercial e excelente valor nutritivo, ademais a composição dos produtos lácteos favorece a utilização e manutenção dos probióticos. De facto, os derivados do leite são bons meios de crescimento para esse grupo microbiano, pois contém fatores e substratos indispensáveis para a fermentação, como açúcares e proteínas. Além disso, os produtos alimentícios como os laticínios são importantes para a resistência dos probióticos ao suco gástrico, particularmente pelo seu efeito tamponante e protetor (Souza et al., 2020).

Os alimentos podem ser considerados "funcionais" inteiros, enriquecidos, fortificados e melhorados e que proporcionam benefícios adicionais para a saúde para além de fornecer ao organismo os nutrientes essenciais (Nazhand et al., 2020). O iogurte é um dos

alimentos funcionais mais conhecidos, por trazer múltiplos benefícios a saúde, sendo uma das principais fontes de cálcio, que é um mineral essencial para a manutenção e formação dos ossos e dentes, além disso o consumo de iogurte pode ainda auxiliar na prevenção da osteoporose e na proteção do coração já que este ajuda a dilatar os vasos sanguíneos. De facto, Chandan et al. (2008) reporta que o iogurte tem grande popularidade quer pelas suas características bem definidas, quer pelos seus benefícios à saúde devido à presença de culturas vivas e ativas favoráveis ao organismo, particularmente por regularem a flora intestinal.

1.1.2. Principal matéria-prima utilizada na produção do iogurte

A principal matéria-prima do iogurte é o leite, uma fonte essencial de nutrientes para a alimentação humana que desempenha um papel crucial na economia global. O leite contribui significativamente para os setores agropecuário e alimentício em diversos países. Prevê-se que as exportações mundiais de leite aumentem em 1,8% (1,3 milhões de toneladas), alcançando 76 milhões de toneladas em 2019. Este crescimento representa uma desaceleração em relação a 2018, quando o aumento foi de 2,8%. Este crescimento é sustentado pela grande quantidade de produção na Nova Zelândia, seguida do México, da União Europeia, da Argentina, Índia e Canadá, contrariamente ao verificado nos Estados Unidos da América e Austrália. O setor de laticínios é de grande importância para a UE, sendo a produção de leite realizada em todos os Estados-Membros, representando uma proporção significativa do valor da produção agrícola da UE, constituindo para alguns Estados-Membros uma parte muito importante da economia agrícola. Os principais produtores são a Alemanha, a França, o Reino Unido, a Polónia, os Países Baixos e a Itália, que representam, em conjunto, quase 70% da produção da UE. A produção total de leite total da UE é estimada em cerca de 170 milhões de toneladas por ano (dados de 2017).

O efetivo leiteiro da UE tem vindo a diminuir nos últimos anos a par de um aumento da produtividade por vaca leiteira. Em 2020, a UE contava cerca de 20 milhões de vacas, com uma produção média de 7 300 kg de leite por cabeça. Neste contexto, podemos perceber que o leite tem grande importância económica e alimentar, já que muitas pessoas

consomem este produto e os seus derivados quase diariamente. O leite é amplamente reconhecido como um alimento extremamente nutritivo e completo, sendo altamente valorizado por sua composição rica em nutrientes essenciais.

Entende-se por “leite cru” o produto da secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40 °C nem submetido a um tratamento de efeito equivalente” (Regulamento (CE) nº 853/2004/CE).

As bactérias ácido lácticas estão presentes em praticamente todos os alimentos como constituintes naturais. No leite cru, correspondem de 20% a 30% do total de bactérias existentes (Delavenne et al., 2012). São um grupo de bactérias com capacidade de produzir diversas substâncias, destacando-se para a produção de derivados lácteos o ácido láctico, que é responsável pelas características únicas de sabor, aroma e textura destes produtos (Ortolani et al., 2010; Hermanns et al., 2013; Tulini et al., 2016; Oliveira, 2017). De facto, as bactérias lácticas responsáveis pela conversão (fermentação) do leite em iogurte consomem os açúcares presentes no leite originando ácido láctico que aumenta a acidez do meio e provoca a coagulação das proteínas, formando uma substância firme que caracteriza o iogurte de textura consistente. Além de modificar a textura, esse aumento na acidez também contribui para a conservação do produto, pois impede a proliferação de bactérias patogénicas (Yildiz, 2016). Convém salientar, que o leite utilizado para a produção de iogurte tem que ser um leite de excelente qualidade microbiológica, já que o uso de leites que não possuam tanta qualidade, como, por exemplo, o produzido por vacas com mastite, (inflamação da glândula mamária da vaca) podem afetar negativamente a consistência e qualidade do iogurte. A presença de resíduos de antibióticos e desinfetantes também traz problemas na produção do iogurte, pois inibe o crescimento das bactérias lácticas necessárias para a fermentação, bem como a de outros microrganismos que podem competir com as bactérias de interesse para o processo, podendo resultar em fermentações lentas e em produtos de baixo corpo (Chandan et al., 2008).

1.1.3. Produção do iogurte

De acordo com a Portaria no 742/92, de 24 de julho (Ministros da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992), o iogurte é um produto coagulado, obtido por fermentação láctica conduzida exclusivamente por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e por *Streptococcus thermophilus* do leite adicionado ou não de ingredientes como, leite em pó, açúcares e edulcorantes, devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final. Essas bactérias induzem um abaixamento do pH do leite, e, conseqüentemente a formação de coágulos.

O processo geral de fabrico do iogurte consiste no pré-tratamento térmico do leite (temperaturas superiores a 90°C) que destrói a microbiota presente, chegando a níveis baixos de microrganismos viáveis. De seguida procede-se à inoculação com aproximadamente 10^7 UFC/g da cultura de bactérias lácticas. Na produção de iogurte em larga escala são incorporados outros ingredientes lácteos, (leite em pó desnatado, soro de leite, leite desnatado e lactose) (Yildiz, 2016), aditivos com atividade de amplo espectro contra leveduras e bolores (sorbato de potássio, benzoato sódio e suas misturas), estabilizantes (gelatina, pectina e ágar-ágar) e flavorizantes (Deeth & Tamine, 1981).

Convém salientar, que o consumo a longo prazo e excessivamente de produtos industrializados ricos em açúcares, gorduras e aditivos estão associados ao aparecimento de doenças crônicas como obesidade, sobrepeso, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, dislipidemias, câncer, entre outras patologias (Deon et al., 2015; Kanter et al., 2018; Correa et al., 2019). Portanto, o iogurte necessita de um olhar crítico quanto a sua composição e qualidade nutricional, a fim de identificar se todos os produtos disponíveis no mercado possuem componentes benéficos para a saúde e se são realmente nutritivos, a fim de garantir aos consumidores os melhores produtos a serem consumidos e que não causarão danos à saúde (Arrúa et al., 2017; Ares et al., 2018; Khandpur et al., 2018).

Na figura 1 apresenta-se o diagrama de fabrico do iogurte.

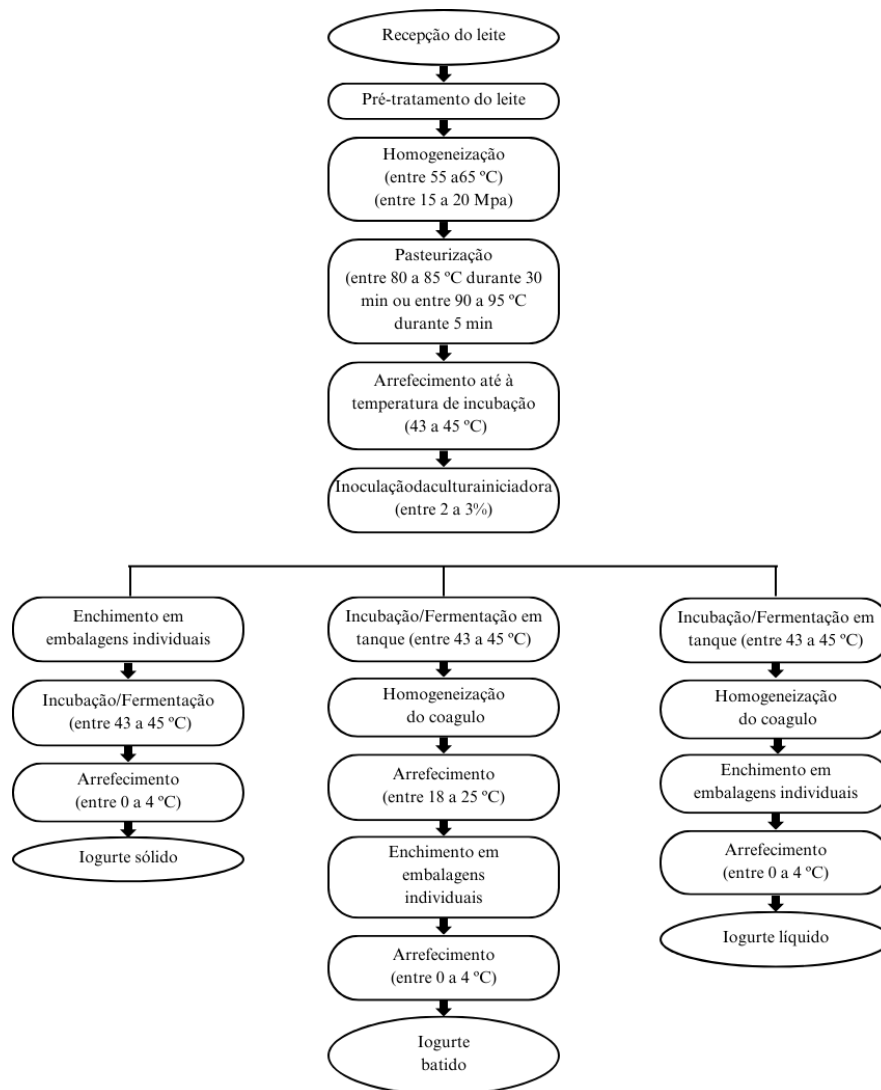


Figura 1: Fluxograma do processo de fabrico do iogurte sólido, batido e líquido (adaptado de Weerathilake et al.,2014; Corrieu & Béal,2016).

A adição de ingredientes lácticos, é feita normalmente para aumentar o teor de sólidos não gordurosos no leite, contribuindo também para melhorar as propriedades sensoriais e o valor nutricional do iogurte. Na produção em pequena e média escala, geralmente apenas se utiliza leite em pó desnatado para aumentar a concentração do leite a ser fermentado e originar um produto mais consistente (Alvarenga, 1995).

Para garantir uma boa homogeneização a mistura dos vários ingredientes é efetuada num tanque com agitação. O leite utilizado na produção do iogurte é previamente

submetido a um intenso tratamento térmico a temperaturas de 80 a 85 °C durante 30 minutos em sistemas descontínuos e de 90 a 95 °C em sistemas de fluxo contínuo. Esse tratamento térmico mais intenso desnatura parcialmente as proteínas do soro, além de destruir microrganismos patogênicos e competidores com os starteres (cultura iniciadora). A ação do calor durante a desnaturação de proteínas libera compostos nitrogenados de baixo peso molecular que estimulam o crescimento das bactérias lácticas. Em seguida é realizada a homogeneização que reduz o diâmetro dos glóbulos de gordura, permitindo a sua distribuição uniforme no iogurte. Melhora ainda a consistência do produto e a estabilidade do coágulo evitando a formação de creme e a separação do soro.

Posteriormente a mistura é homogeneizada e resfriada até a temperatura ideal para o crescimento dos microrganismos de interesse, adiciona-se a cultura iniciadora. As bactérias ácido lácticas (LAB) são inoculadas numa quantidade normalmente de 2 a 3% do volume total de leite para produzir o iogurte. De seguida procede-se à incubação a uma temperatura entre 41 a 45 °C, durante 4 a 6 horas, até atingir um valor de pH que oscila entre 4,5 e 4,7, necessário para o crescimento destes microrganismos.

No mercado, atualmente estão disponíveis diversos tipos de iogurtes nomeadamente acrescentadas de geleias, polpas entre outros ingredientes. De facto, nos últimos anos, para melhorar a qualidade e bioatividade do iogurte, têm sido adicionados polifenóis e sementes de frutas, fibra dietética e extratos de plantas (Liu, 2018). Com efeito, hoje em dia verifica-se um interesse crescente por princípios bioativos provenientes de matérias-primas naturais para o desenvolvimento de produtos funcionais estáveis (Molina et al., 2019), podendo também emergir novas tendências na produção de produtos lácteos funcionais e saudáveis (Yildiz & Ozcan, 2019).

Quanto à textura do produto, de acordo com o processo de elaboração os iogurtes podem ser classificados em: batidos, líquidos e tradicionais, que são aqueles que tem uma consistência firme. A fase inicial do processo é igual para todos os tipos de iogurte a diferença está na fase de fermentação. No iogurte tradicional o processo de fermentação ocorre dentro da própria embalagem, já nos iogurtes batidos e líquidos a fermentação tem lugar dentro de incubadoras ou tanques. Os iogurtes líquidos e batidos diferem apenas no grau de rutura do gel formado, o batido é bombeado para um trocador de calor para

resfriar e, o líquido é submetido a um processo mais intenso, como a homogeneização (Ordóñez, 2005).

O pH diminui na etapa da fermentação devido a formação de ácido lático resultante do crescimento bacteriano. A um pH de 5,2 - 5,3 a caseína começa a destabilizar e iniciasse a precipitação, que fica completa ao atingir pH 4,6 - 4,7, valor que representa o ponto isoelétrico da caseína (Chandan et al. 2008). Na etapa seguinte é feito o resfriamento que tem por objetivo reduzir a atividade metabólica da cultura iniciadora, para que o processo fermentativo não prossiga. As temperaturas de armazenamento não devem exceder 5°C para garantir que a degradação física, química e microbiológica seja retardada e o iogurte esteja apto para consumo pelo menos até 15 ou 20 dias após a produção. O resfriamento muito rápido pode afetar a estrutura do coágulo, levando à separação do soro devido à intensa retratação das suas proteínas, que afeta a capacidade de retenção de água (Ordóñez, 2005). Por fim procede-se ao envase e ao armazenamento, sendo que o envase pode ser realizado tanto antes da fermentação (iogurte de consistência firme) como após a fermentação (iogurte batido). A embalagem utilizada deve ser hermeticamente fechada e opaca, para proteger da luz.

1.1.4. Composição química e nutricional

Primeiramente, para se conhecer a composição do iogurte é preciso conhecer a composição do leite utilizado para a sua produção (principal matéria-prima). Convém salientar que, o leite tem alto valor nutricional, os seus nutrientes são equilibrados e contém substâncias necessárias ao sistema imunológico. De acordo com Brandão (1995), da composição físico-química do leite 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.

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. No leite cru as substâncias capazes de inibir a ação dos microrganismos são inativadas rapidamente depois da ordenha, tornando o leite suscetível

à proliferação de microrganismos indesejáveis (patogénicos e de deterioração), salienta-se que são várias as fontes que podem contribuir para a contaminação do leite, a referir: animais, durante a ordenha quando há falta de higiene na operação, equipamentos, manipuladores, ar, durante o processamento e transporte (Franco & Landgraf, 1996).

Como o iogurte é considerado um dos principais produtos lácteos, a sua composição é semelhante à do leite, embora com ligeiras diferenças devido a mudanças ocorridas durante a fermentação bacteriana da lactose, pela adição de outros ingredientes lácteos, aditivos químicos/ naturais, estabilizantes e flavorizantes. Na Tabela 1, podemos observar a composição nutricional do iogurte natural sólido meio gordo.

Tabela 1: Composição nutricional do iogurte natural meio gordo (Adaptado da Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2014).

Iogurte Natural Sólido meio gordo	
Energia (KJ/Kcal)	226,00/54,00
Proteínas (g)	4,20
Gordura (g)	1,80
Hidratos de Carbono (g)	5,0
Lactose (g)	5,0
Vitamina A (µg)	30,00
Tiamina (mg)	0,03
Riboflavina (mg)	0,24
Niacina (µg)	0,20
Folatos (µg)	1,70
Cálcio (mg)	118,00
Fósforo (mg)	108,00
Magnésio (mg)	12,00
Zinco (mg)	0,5

O iogurte é uma rica fonte de cálcio, fósforo, proteína, hidratos de carbono e vitaminas. O consumo deste produto está relacionado à imagem positiva de alimento saudável e nutritivo, bem como, às suas propriedades sensoriais (Teixeira et al., 1987). De seguida apresentam-se os principais benefícios do iogurte.

1.1.5. Benefícios para a saúde resultantes do consumo de iogurte

O iogurte é conhecido principalmente pelo seu efeito na regulação da flora intestinal e pelo elevado teor em cálcio, mas os seus benefícios vão além disso.

As proteínas provenientes do iogurte, além de serem em maior concentração que no leite, pois a maioria dos iogurtes são enriquecidos com componentes sólidos de alto valor biológico (contém todos os aminoácidos essenciais à saúde) (Mckinley, 2005; Wang et al., 2013). Outro benefício está relacionado com o sistema imunológico. Como referido anteriormente o iogurte é produzido pela ação de, no mínimo, dois tipos específicos de estirpes bacterianas, sendo as principais *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, as quais ajudam a flora intestinal e aumentam a resistência do organismo, pois impedem a multiplicação da maior parte das bactérias patogénicas. Com efeito, são atribuídas às bactérias presentes no iogurte a capacidade de inibir o desenvolvimento de micro-organismos potencialmente patogénicos no sistema digestivo, através da competição. Também, o iogurte é considerado um veículo de microrganismos probióticos (Buttriss, 1997; Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

O consumo regular de alimentos probióticos, como é o caso dos iogurtes, pode ajudar a reduzir a pressão arterial, isso acontece porque este produto lacteo, além de reduzir o colesterol no sangue, é resistente à insulina (usada para o tratamento de diabetes), ajudando a regular o sistema hormonal que controla o fluxo sanguíneo.

Vários investigadores avaliaram o efeito do consumo de iogurte nos níveis de colesterol, tendo como exemplo o site americano Healthline (2013), que realizou um estudo relacionando o consumo de iogurte aos níveis de pressão arterial e colesterol. Verificaram que, os consumidores de iogurte pareciam ter um perfil metabólico melhor do que aqueles que não consumiam iogurte. Isso significa que eles tinham um índice de massa corporal (IMC) mais baixo, circunferência da cintura menor, bem como níveis mais baixos de triglicérides, glicose em jejum e insulina, e pressão arterial. Eles também apresentam níveis mais elevados de lipoproteínas de alta densidade (HDL), isto é, colesterol “bom”. Outras pesquisas atribuíram a capacidade do iogurte reduzir o colesterol ao seu conteúdo probiótico. Um estudo britânico constatou que duas doses diárias de um probiótico reduziram as moléculas de colesterol-chave no sangue, bem

como os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ou "mau" colesterol. Os autores não conseguiram determinar se os efeitos positivos foram devido aos probióticos em si ou ao próprio iogurte, ou a uma combinação de ambos.

1.1.6. Culturas lácticas

As bactérias lácticas que realizam a fermentação do leite são divididas em duas categorias: as homofermentativas que metabolizam os açúcares, com produção principalmente de ácido lático e são responsáveis pela coagulação da caseína do leite e, o grupo hétéro fermentativo que converte os açúcares com produção de ácido lático, ácidos acético, succínico e pirúvico, álcoois e gás. Estes dois grupos de bactérias podem crescer separadamente, porém juntas produzem uma maior quantidade de ácido lático. Os produtos resultantes do seu metabolismo (*S. salivarius ssp. thermophilus* e *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus*) contribuem para o sabor e consistência do iogurte. Os aminoácidos e peptídeos presentes no leite são utilizados por ambas as bactérias, somente na quantidade necessária para permitir o seu crescimento no início da fermentação. É necessário também a conversão de algumas das proteínas do leite em peptídeos e depois em aminoácidos. Como *Lactobacillus* é o único dos dois microrganismos que possui proteases, *Streptococcus* conseguem crescer graças a esses peptídeos liberados por *Lactobacillus*. Ao longo da fermentação, são formados compostos carbonílicos como acetaldeído, acetona, diacetil e etanol, sendo estes os responsáveis pelas propriedades organolépticas do iogurte. Os principais componentes do aroma e do sabor são aldeídos e cetonas, sendo o acetaldeído e o diacetil os que mais destacam-se (Ordoñez, 2005).

As bactérias ácido lácticas (BAL) possuem como características serem Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, imóveis, anaeróbias, e são aerotolerantes, fastidiosas com relação a alguns aminoácidos e possuem considerável tolerância a ácidos, o que lhes confere vantagem competitiva sobre outras bactérias (Oliveira et al., 2018). As culturas de bactérias lácticas desenvolvem simultaneamente a relação simbiótica reduzem o tempo de fermentação, uma vez que seu crescimento articulado é mais rápido do que o desenvolvimento de uma cultura pura de cada um deles. Além disso, a soma dos valores da proteólise total de cada cepa é inferior à proteólise da cultura mista. A associação de

ambas as cepas estimulam a produção de outros metabólitos como acetaldeído. Por exemplo, a cepa de *L. bulgaricus* isolada não metaboliza a galactose, no entanto consegue utilizar esse açúcar quando se associa a *S. Thermophilus* (Bourgeois et. al., 1995). Estas bactérias produzem mais ácido em cultura mista do que em cultura pura (Thamer, 2006). A velocidade de crescimento dos streptococos é superior à dos bacilos, produzem ácido fórmico, dióxido de carbono e utilizam o oxigênio, estimulando o crescimento dos bacilos. Já a atividade proteolítica dos bacilos libera peptídeos e aminoácidos que favorecem o crescimento dos cocos, ressaltando a relação benéfica do uso em conjunto das duas espécies (Yildiz, 2016; Chandan et al., 2008).

1.1.7. Aditivos

Segundo o Regulamento (UE) nº 1333/2008, art.º 3º, nº2, alínea a, do Parlamento Europeu, entende-se por aditivos alimentares quaisquer substâncias não consumidas habitualmente como géneros alimentícios em si mesmas e habitualmente não utilizadas como ingredientes característicos dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos alimentos com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que elas próprias ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente componentes desses géneros alimentícios. Este regulamento estabelece todas as orientações necessárias para o uso de aditivos. De maneira concisa, os aditivos alimentares são componentes incorporados aos produtos alimentares com a finalidade de preservar, potencializar ou acentuar suas propriedades físicas e organolépticas, a fim de prevenir possíveis deteriorações, tais como a degradação da cor e do sabor, bem como o desenvolvimento de microrganismos, entre outros processos indesejáveis, é um ingrediente colocado nos alimentos variando conforme sua função: conservante, espessante, estabilizante, emulsionante, entre outras.

Nos rótulos dos alimentos, podem ser citados pelo nome da substância utilizada ou pelo código "E". As condições de uso dos aditivos alimentares são regulamentadas, ou seja, de acordo com a dosagem permitida e os alimentos nos quais podem ser usados. Portanto, os aditivos alimentares podem não causar problemas de saúde se forem usados

em condições estabelecidas e consumidos nas quantidades recomendadas. Atualmente, estão descritos aproximadamente 2.500 aditivos alimentares que podem ser utilizados pela indústria alimentícia.

Para se evitar a deterioração de algum alimento, utiliza-se a conservação, uma técnica empregada aos alimentos que visa aumentar a vida de prateleira, mantendo-os livres de microrganismos que provoquem alteração em sua qualidade microbiológica e organoléptica, bem como para realçar o sabor, textura, cor e aroma sem que haja alteração nas características sensoriais do mesmo. Atualmente há vários métodos de conservação de alimentos, no geral podemos classificá-los como conservantes sintéticos ou naturais (Sharif et al., 2017).

Aditivos alimentares sintéticos. Na atualidade, os alimentos processados para chegarem até aos consumidores precisam de percorrer longas distâncias e, portanto, é necessário assegurar a chegada ao destino nas melhores condições de qualidade e segurança. Assim, para prevenir contaminações e deterioração dos alimentos esta a ser utilizados aditivos alimentares (Carocho et al., 2014). Os conservantes sintéticos vêm sendo utilizados com moderação, pois estudos apontam diversos malefícios para saúde humana relacionados ao seu uso em excesso.

Na formulação tradicional de iogurtes, os aditivos eram utilizados como espessantes, aromatizantes, acidulantes, conservantes e corantes. No entanto, convém salientar que, quando em excesso, podem representar um risco para a saúde do consumidor, particularmente 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 (Polônio & Peres, 2009). No iogurte os conservantes mais usados para prolongar o tempo de vida de prateleira são o ácido sórbico e sorbatos, ácido benzóico e benzoatos e anidro sulfuroso. Segundo a Legislação Portuguesa, o sorbato de potássio (aditivo sintético) está autorizado na produção de iogurte, desde que respeite os limites máximos de utilização que neste caso são 300-2000 mg/kg, sendo esses valores de acordo com o Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão Europeia (Parlamento Europeu, 2008). Este composto é amplamente usado em produtos alimentares por inibir o 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.

Aditivos alimentares naturais. Os conservantes naturais são aditivos utilizados com a intenção de conservar, minimizar a oxidação e o crescimento bacteriano nos alimentos, de forma a mantê-los próprios para consumo, sem alterar as suas características sensoriais.

Os aditivos naturais são substâncias provenientes de fontes orgânicas, como plantas, animais e microrganismos. Estes aditivos são derivados de matérias-primas com composição variável. Deste modo, tanto a quantidade quanto a qualidade das substâncias ativas, bem como a presença de diversos outros compostos, são influenciadas pela natureza específica do substrato que serviu como base, pelas condições climáticas vigentes e por diversos outros fatores. Galo et al. (2018), define conservantes naturais como substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos capazes de conferir alguma característica ou melhorar outras, como as propriedades de armazenamento. Sendo moléculas de origem natural que apresentam atividade biológica na conservação alimentar, tem função antioxidante, se enquadrando deste modo na conservação dos alimentos. Podem ser classificados em agentes antimicrobianos e antioxidantes (Sharif et al., 2017). Os antimicrobianos são compostos microbicidas ou microbiostáticos, que agem matando, inibindo ou reduzindo o crescimento de microrganismos indesejáveis no alimento, que provocam alterações e conseqüentemente tornando-os impróprios para o consumo. Os agentes antioxidantes atuam no alimento impedindo a rancidez oxidativa, visto que, a oxidação é uma das principais razões para deterioração de alguns produtos alimentícios (Tiwari et al., 2009), afetando conseqüentemente o seu comércio e o consumo

Os antioxidantes naturais, como por exemplo o ácido ascórbico, são considerados menos prejudiciais para o organismo, no entanto apresentam baixa estabilidade (Naidu, 2003). Nesta perspectiva, verifica-se a necessidade de investigar produtos naturais encontrados na biodiversidade, que apresentem menores efeitos colaterais e que possuam maior estabilidade. Atualmente os conservantes sintéticos vêm sendo utilizados com moderação, pois tal como referido anteriormente, a bibliografia reporta diversos

malefícios relacionados ao seu uso em excesso para saúde humana. Desse modo, devido à grande procura, pela população, por alimentos menos industrializados, o uso de conservantes naturais estão em crescimento, com isso, as indústrias buscam cada vez mais suprir as necessidades desse grupo de pessoas (Leonardi & Azevedo, 2018). Conforme reportado por Pokorný (2001), os aditivos 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).

1.1.8. Probiótico

A palavra probiótico deriva do grego que significa "para a vida" (Lourens-Hatting & Viljoen, 2001). Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 90, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Só em 2001, surgiu um consenso na definição de probióticos. O termo, tal como definido originalmente pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), após a avaliação das propriedades de saúde e nutricionais dos probióticos na alimentação, definiu os probióticos como “Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”.

O iogurte se destaca na categoria de alimentos probióticos, porque contém bactérias e leveduras que quando ingeridas em doses adequadas conferem equilíbrio para a microbiota intestinal e geram benefícios à saúde do indivíduo. Se o intestino de um adulto estiver saudável, a microflora predominante é constituída por microrganismos promotores da saúde, na sua maioria pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Moraes et al., 2006). Saad (2006), reportaram que os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, diminuição da concentração dos ácidos acético e lático, de bacteriocinas

e outros compostos antimicrobianos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a este açúcar, estimulação do sistema imune, alívio da prisão de ventre e aumento da absorção de minerais e vitaminas.

Os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis por longo período de tempo durante o armazenamento e transporte, tolerar os valores baixos de pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais, não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, bem como resistência a fagos e ao oxigênio (Havenaar & Huis in't veld, 1992). Para ter efeitos benéficos na saúde segundo Iannitti e Palmieri (2010), recomendam uma quantidade de $5 \cdot 10^9$ UFC (Unidade Formadora de Colónias)/dia durante 5 dias. A legislação portuguesa em vigor estabelece que, a contagem da flora específica do iogurte, com vitalidade própria, deve ser no mínimo de 5×10^7 UFC/g (Portaria nº 742/92). A FAO/OMS, o Codex Stan 243-2003, e a legislação brasileira (Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução Nº 5 de 13 de novembro de 2000), indicam que a contagem total de bactérias lácteas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/g no produto final, durante todo o tempo de vida de prateleira. Produzir iogurte apenas com microrganismos probióticos não é viável do ponto de vista econômico e comercial devido ao aumento do tempo de fermentação necessário para baixar o pH do leite para 4,6 e ao sabor desagradável causado por algumas cepas probióticas.

1.2. A árvore Tramazeira

1.2.1. Caracterização e distribuição da Tramazeira

A tramazeira (*Sorbus aucuparia*), também vulgarmente conhecida como cornogodinho, sorveira, escancerejo, pertence à família das Rosáceas que inclui também outras plantas conhecidas como a cerejeira (*Prunus avium*), a pereira (*Pyrus communis*), a macieiras (*Malus sylvestris*) e muitas outras. É uma árvore que pode atingir 4 a 15 metros de altura com uma copa aberta arredondada, as folhas são compostas, e as flores brancas, agrupam-se em corimbos terminais, que quando fertilizados produzem frutos vermelhos brilhantes (parecem bagas), do tamanho de uma ervilha grande, como pode ser

observado na Figura 2. Floresce de maio a julho e os frutos amadurecem normalmente no final de setembro. A tramazeira é bastante conhecida pelo fato de seus frutos serem um grande atrativo para os pássaros que se alimentam deles, motivo pelo qual os caçadores utilizavam como isca em armadilhas para atrair as aves. Por isso, a espécie recebeu o nome "*aucuparia*", que deriva do latim "*aucupor*" que significa caçar pássaros.



Figura 2: Fruto da árvore Tramazeira (Árvores e Arbustos de Portugal)

Em relação à distribuição geográfica da tramazeira verifica-se que é uma espécie nativa da Europa e da Ásia Menor, é encontrada em locais expostos, rochosos e íngremes, acima de 1000 m. Em Portugal Continental, ocorre naturalmente nas regiões de montanha do Norte e Centro, nomeadamente nas serras do Gerês, Cabreira, Larouco, Montesinho, Gardunha e Estrela. É muito rara no Sul e na faixa litoral (Figura 3).

Acredita-se que o gênero *Sorbus* possa ter origem no leste da Ásia tendo depois migrado para a Europa e América do Norte (Jankun, 1993). Há várias espécies distribuídas nas zonas temperadas do hemisfério norte, sendo que segundo Phipps et al. (1990) existem 91 espécies na Europa e pelo menos 111 espécies na China, Vietname, Birmânia e Himalaia.

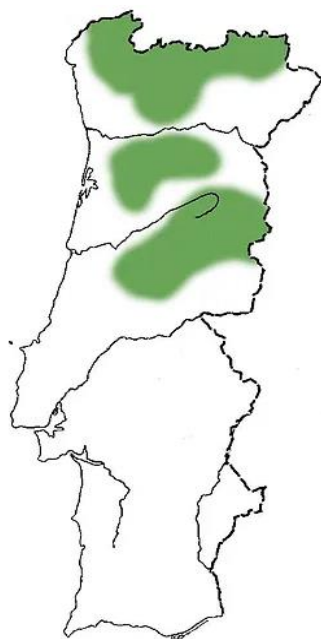


Figura 3: Zonas de cultivo de Tramazeira em Portugal (Florestar.net, 1753)

1.2.2. Caracterização bioquímica

O fruto contém sorbitol, ácidos orgânicos (sorbico, málico, cítrico e tartárico), açúcares, pectina, vitamina C e provitamina A, taninos e compostos fenólicos. O ácido sorbico (um conservante de alimentos com propriedades principalmente antifúngicas) e o sorbitol um poliol (de sabor doce usado como adoçante) podem ser extraídos da sorveira-brava. Já a semente contém glicosídeos cianogênicos, que ao se ligarem com a água originam ácido cianídrico, altamente tóxico para humanos, mas não para as aves.

O fruto da tramazeira não é popularmente conhecido no mercado mas possui alguns benefícios à saúde, destacando-se o potencial antioxidante devido ao elevado número de compostos fenólicos, que vem sendo bastante estudados para avaliar a atividade biológica de algumas espécies de *Sorbus*.

Os frutos podem ser tóxicos quando consumidos frescos devido à presença de ácido parasorbico, que pode causar desconforto gastrointestinal. No entanto, ao serem fervidos ou tratados pelo calor, o ácido parasorbico é convertido em ácido sorbico, que é inofensivo e utilizado como conservante alimentar por suas propriedades antimicrobianas. Esse processo de transformação ocorre através da hidrólise facilitada

pelo calor, eliminando a toxicidade dos frutos e melhorando sua digestibilidade e a disponibilidade de compostos benéficos.

Portanto, o tratamento térmico é essencial para tornar os frutos da tramazeira seguros para o consumo. mas quando fervido ou tratado pelo calor, a toxicidade desaparece obtendo-se um fruto com elevado valor agregado podendo ser utilizadas como ingrediente para fazer geleias e molhos, por exemplo. Em algumas regiões da Europa a partir de processos fermentativos são elaborados licores e vinagres. Também, tem sido tradicionalmente usados em vários alimentos processados devido à sua elevada bioatividade. Do ponto de vista ecológico, os seus frutos são uma importante fonte de alimentos para as aves (Mitchell, 1974).

1.2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos pelo reino vegetal. São conhecidos mais de 8.000 compostos fenólicos com estruturas químicas diferentes e, conseqüentemente, com atividades biológicas diversas (Yáñez et al., 2004; Yazaki et al., 2009). São definidos como substâncias que possuem anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxila (OH), incluindo seus derivados funcionais. Estes compostos estão relacionados com a pigmentação, odor e sabor de diversos vegetais, ou aos processos de defesa do organismo vegetal, por esse motivo são denominados metabólitos secundários, isto é, substâncias produzidas pelos seres vivos que são indispensáveis ao seu crescimento. Os compostos fenólicos, considerados compostos bioativos, dividem-se em ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos e estilbenos (Figura 4) (Ferreira & Abreu, 2007). Um dos exemplos de classificação de compostos fenólicos é de acordo com o tipo do esqueleto principal como apresentado na Tabela 2, onde C6 conta o anel benzênico e Cn, o número de carbonos presente na cadeia substituinte.

A estrutura dos compostos fenólicos pode variar entre uma simples molécula fenólica a polímeros complexos de elevado peso molecular (Balange & Benjakul, 2009; Vaquero et al., 2007).

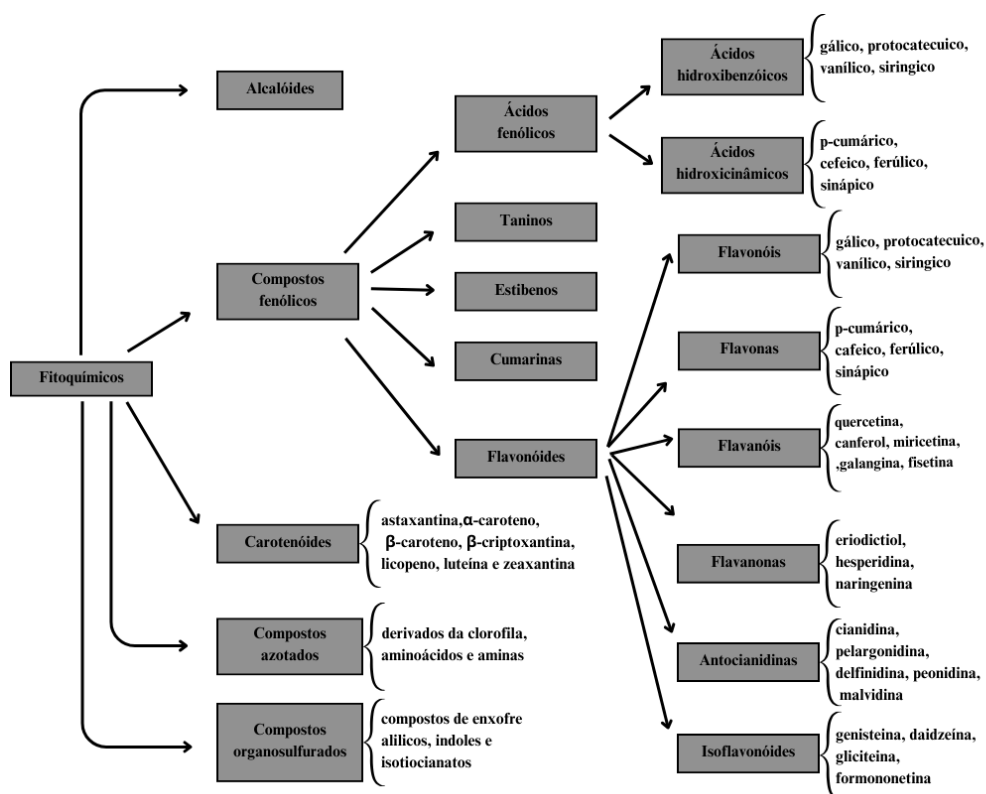


Figura 4: Principais classes de fitoquímicos naturais.

Tabela 2: Classe de compostos fenólicos em plantas (Adaptado Angelo & Jorge, 2007).

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzoicos	C6–C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6–C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6–C3
Nafitoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6–C1–C6
Estilbenos, antoquinonas	C6–C2–C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6–C3–C6
Lignananas, neolignananas	(C6–C3)2
Biflavonóides	(C6–C3–C6)2
Ligninas	(C6–C3)
Taninos condensados	(C6–C3–C6)

A maioria destes compostos ocorre naturalmente conjugados a mono- ou oligossacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, podendo também ocorrer como derivados funcionais como ésteres ou metil ésteres (Balasundram et al., 2006; Hurtado-Fernández et al., 2010; Vichapong et al., 2010).

O conteúdo de compostos fenólicos nos alimentos depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos (os que mais interferem nas diferentes composições) incluem o género, a espécie e a cultivar, enquanto os fatores extrínsecos englobam questões geográficas, agronómicas e ambientais, para além da forma como os alimentos são manuseados e armazenados. Estes compostos podem atuar como antioxidantes, contribuindo para a pigmentação, atraindo polinizadores e atuam também como agentes protetores contra luz UV e patógenos (Wrolstad et al., 2005). Segundo Silva et al. (2015) essa ação antioxidante, comum dos compostos fenólicos, deve-se ao potencial de redução de determinadas moléculas, à capacidade dessas moléculas em competir por sítios ativos e recetores nas diversas estruturas celulares ou, ainda, à modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos e degenerativos de estruturas celulares. Estes compostos são amplamente utilizados pela indústria alimentar como aromatizantes, corantes e para prevenir a oxidação lipídica, que pode alterar significativamente a vida de prateleira de produtos industrializados. Nos alimentos, podem afetar o valor nutricional e a qualidade sensorial, conferindo cor, textura, amargor e adstringência. Salienta-se que, quando em concentração muito elevada ou em composição inadequada, estes compostos podem conferir características indesejáveis, nomeadamente escurecimento enzimático de frutas e a interações com proteínas, carboidratos e minerais (Imeh & Khokhar, 2002).

O crescente interesse nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos de diferentes fontes vegetais deriva também da sua elevada actividade e baixa toxicidade em comparação com as dos antioxidantes fenólicos sintéticos, tais como o butil-hidroxitolueno (BHT) ou o butil-hidroxianisol (BHA), que são normalmente utilizados como antioxidantes em alimentos processados (Nakatani, 1996). Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos). Os principais compostos fenólicos não-

flavonóides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (Figura 5) são os ésteres dos ácidos caféico, cumárico e ferúlico, que estão presentes em alimentos como maçã, pêra, cereja e damasco. Quanto aos derivados dos ácidos hidroxibenzoicos (Figura 6), podem-se destacar os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico, que são encontrados em morango, uva, laranja, limão e tangerina (Belitz & Grosch, 2004).



Figura 5: Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos (Costa, 2009).

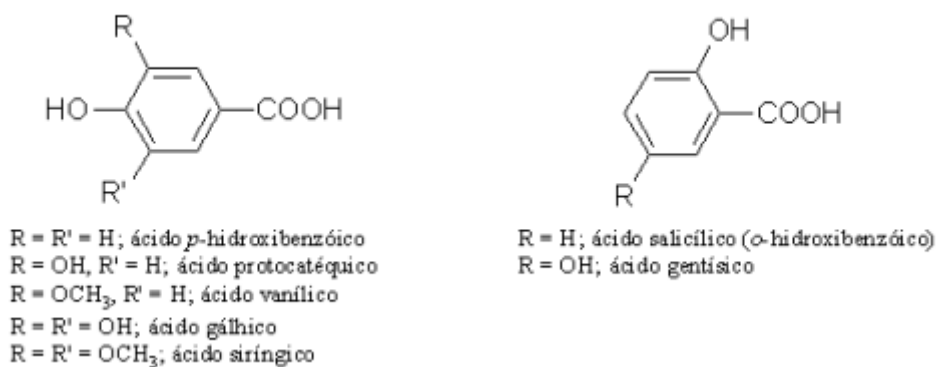


Figura 6: Estruturas químicas dos principais ácidos hidroxibenzoicos (Costa, 2009).

Estudos realizados com os compostos fenólicos para além de demonstram sua capacidade antioxidante, evidenciaram também o seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (Harborne & Williams, 2000; Sánchez-Moreno, 2002).

Como já comentado, a tramazeria (*Sorbus aucuparia*), tem uma vasta quantidade de compostos e nutrientes benéficos à saúde, é conhecido pelo poder antioxidante do seu

fruto, sendo isto consequência principalmente dos seus compostos fenólicos. Recentemente, (Hukkanen, 2006; Termentzi et al., 2006) reportaram que a atividade antioxidante de alguns frutos de *Sorbus* estava relacionada com os compostos polifenólicos. Diversos autores realizaram estudos visando verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos, largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por chegarem a aumentar a vida útil de muitos produtos entre 15 e 200% (Durán & Padilla, 1993). Embora tenham sido realizados diversos estudos comprobatórios da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos *in vitro*, pouco se sabe a respeito do comportamento destas substâncias *in vivo*. Há poucas evidências que levam a crer na ação destas substâncias no sistema biológico de forma similar à vitamina C no processo de regeneração do α -tocoferol (Nardini et al., 1997).

A Tramazeira (*Sorbus aucuparia*) pode ser um substituto natural aos conservantes artificiais nos alimentos, devido ao seu potencial antioxidante em decorrência dos compostos fenólicos presentes no fruto. Além de que um dos principais compostos presentes no fruto é o ácido sorbico, que é utilizado como conservante químico em diversos alimentos. De facto, os estudos sobre a utilização dos frutos desta planta como conservantes de alimentos, são escassos ou inexistentes o que justifica o tema do nosso trabalho.

1.2.5. Atividades biológicas

Atividade Antioxidante. Segundo Vasconcelos (2014), “Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação do substrato”. Ainda podem ser denominados de “scavenger”, quando ele age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “quencher”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação. 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, começando desde a infância, na qual os efeitos prejudiciais dos radicais livres tendem a ser mais significativos em comparação com a

fase adulta, até a idade avançada, na qual os idosos são particularmente propensos a sofrer danos resultantes da oxidação.

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).

Existe uma grande variedade de antioxidantes sintéticos, sendo 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., 2013). Alguns exemplos de antioxidantes naturais são os compostos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides e tocoferóis (Carocho et al., 2015). Devido às potenciais complicações decorrentes do uso de antioxidantes sintéticos, os estudos têm se direcionado para a identificação de substâncias naturais com propriedades antioxidantes, visando sua substituição ou combinação com os sintéticos.

Atividade Antimicrobiana. Questões relacionadas principalmente ao risco da presença de microrganismos multirresistentes na cadeia alimentar podem levar ao desenvolvimento de doenças transmitidas por alimentos. Por conseguinte, tem havido uma procura crescente de conservantes naturais de origem vegetal com atividade antimicrobiana (Tamkute et al., 2019).

Nesse contexto, a tramazeira apresenta-se como uma fonte promissora de conservantes naturais. Da tramazeira é possível extrair ácido sórbico, um conservante para alimentos com ação particularmente eficaz contra fungos. Além disso, o ácido ascórbico, liberado durante a cocção das bagas de tramazeira, não só é um excelente antioxidante, mas também demonstra propriedades antimicrobianas. De acordo com Lacombe et al. (2017), as bagas e seus constituintes, como compostos fenólicos e ácidos orgânicos, podem inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Estudos mostram que extratos de frutas de *S. aucuparia*, obtidos com 50% de etanol, inibiram o crescimento de *Bacillus cereus*

MSCL 330, *Staphylococcus aureus* MSCL 334 e *Pseudomonas aeruginosa* MSCL 331 (Liepina et al., 2013).

Outras atividades. O fruto da Tramazeira também é uma boa fonte de vitamina C (ácido ascórbico), que é um antioxidante relevante para a manutenção de uma boa função no sistema imunológico, evitando algumas doenças como gripe. Adicionalmente, a fracção triterpenóide dos frutos Tramazeira contém algumas citocinas selectivas (TNF- α , IL1 β , IL-6), MDA (peroxidação lipídica malondialdeído), SOD (superóxido dismutase), GSH (glutationa), CAT (catalase), aminotransferases (AST, ALT), que demonstraram efeitos positivos na necrose dos tecidos hepáticos, hemorragia e infiltração de células inflamatórias (Yin et al, 2019).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem de frutas de Tramazeira

O presente trabalho foi realizado no laboratório da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança, na cidade de Bragança, Portugal. As amostras utilizadas, foram frutas de Tramazeira, recolhidas no Polis, em Bragança. As primeiras colheitas ocorreram nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro, de 2022.

Os frutos foram retirados juntamente com as folhas com auxílio de uma tesoura de poda, posteriormente, após a remoção das folhas os frutos foram levados para o laboratório. No laboratório, os frutos depois de avaliada a sua integridade, foram limpos (remoção de sujidades como terra e pedras) e pesados. Posteriormente, a fruta da Tramazeira foi desfeita e separada através de um coador que permitia separar a semente e a casca da polpa do fruto. Em seguida foram liofilizados, para reduzir a quantidade de água do fruto, e armazenadas num local fresco, até à realização das análises. Na Figura 7 podemos observar o fruto de tramazeira em três diferentes estágios a polpa liofilizada, a polpa e o fruto inteiro, observando a figura da esquerda para direita.

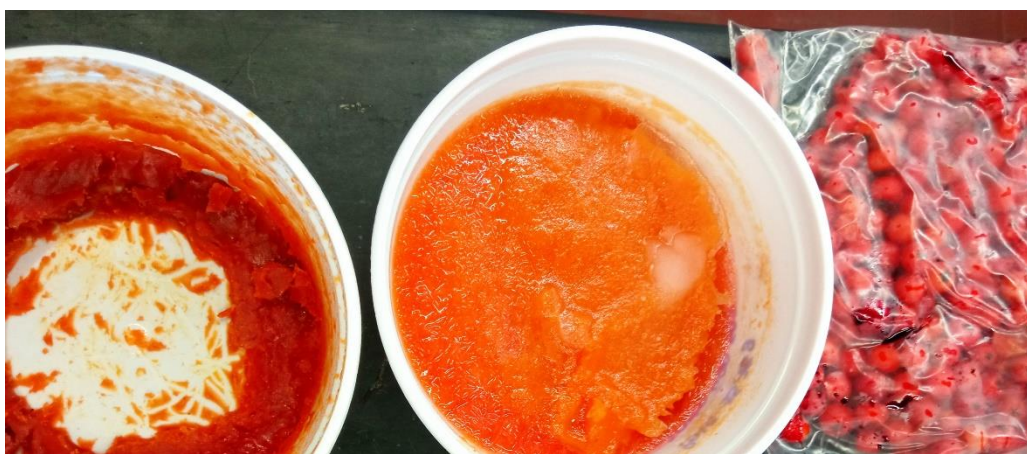


Figura 7: Polpa liofilizada, polpa e fruto de Tramazeira.

2.2. Optimização do extrato hidro-etanólico das frutas

Para otimizar as condições de extração do fruto da Tramazeira seguiu-se um desenho experimental com 14 ensaios (projeto composto central - CCD) (Figura 8), em cada

ensaio pesou-se cerca de 1,0 g da polpa liofilizada em tubos de ensaio e adicionou-se 20 mL de soluções extratoras de diferentes concentrações hidro-etanólicas (v/v). A percentagem de etanol variou entre os valores 24 e 95,4%, e os valores de pH, entre 0,9 e 4,9, como representado na Tabela 3. Em seguida foi mantido sob agitação até diluição completa, posteriormente essa mistura foi filtrada em papel filtro Whatman e armazenada em local fresco. O rendimento da extração foi calculado através da diferença de pesos dos matrizes (vazios e com o extrato do fruto de Tramazeira seco).

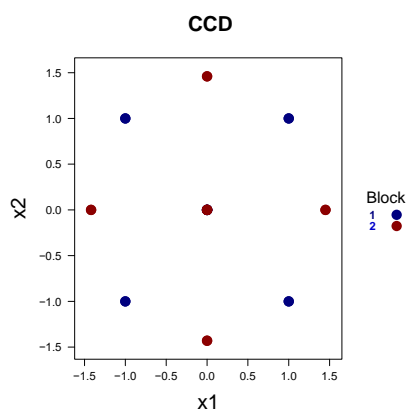


Figura 8: Variáveis de resposta.

Para o estudo de otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta (modelo matemático de segundo grau) como resultado dos ensaios efetuados usaram-se os seguintes dados analíticos:

- potencial antioxidante, avaliadas pela capacidade de neutralização do radical DPPH e pela capacidade redutora/antioxidante férrico, através do método FRAP;
- compostos fenólicos totais por meio do método de Folin-Ciocalteu, bem como à determinação dos flavonoides totais com a utilização do reagente cloreto de alumínio (AlCl_3);
- açúcares sacarose, glucose, frutose e sorbitol por HPLC.

Tabela 3: Desenho experimental para otimização do extrator hidro-etanólico

Ensaio	Etanol (%) x1	pH de HCl _{aq} x2
1	60	3,01
2	60	3,01
3	85	4,5
4	60	3,01
5	35	1,5
6	35	4,5
7	85	1,5
8	60	3,01
9	24	3,01
10	95,4	3,01
11	60	0,87
12	60	5,14
13	60	3,01
14	60	3,01

2.3. Análise de compostos fenólicos e atividade biológica

Compostos fenólicos totais. O método utilizado para determinar a quantidade total de compostos fenólicos foi o de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Para analisar os fenóis totais em cada ensaio do desenho experimental, foram adicionados 0,5 ml da amostra (1 g de polpa liofilizada em 20 mL da respectiva solução extratora), 1,5 mL de água, 0,2 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 0,2 mL de carbonato de sódio a 75 g/L. A solução resultante foi mantida no escuro por 30 minutos. Após esse período, a absorbância das soluções foi medida a 760 nm usando um espectrofotômetro (UV-3100PC). Os cálculos foram realizados usando uma curva de calibração preparada com o padrão ácido gálico (AG). Para a construção da curva pesou-se 0,1 g de ácido gálico, dissolveu-se em 100 mL de água desionizada (solução mãe). As diferentes concentrações foram obtidas pela medição dos volumes 0,5; 0,6; 0,75; 1; 1,50; 2 e 3 ml para balões de 25 ml que foram aferidos com água desionizada. Os resultados foram expressos em miligramas de AG equivalente por grama de amostra.

Flavonoides totais. O método utilizado para determinar a quantidade total de flavonoides foi o de Woisky & Salatino (1998). Neste procedimento, 0,5 mL da amostra (1 g de polpa liofilizada em 20 mL da solução extratora definida para cada ensaio do desenho experimental) foram pipetados juntamente com 2 mL de água e 2,5 mL de AlCl₃ a 2% (m/v). A solução resultante foi deixada em repouso no escuro por 1 hora e as absorvâncias das soluções foram medidas a 420 nm. Os cálculos foram realizados usando uma curva de calibração preparada com o padrão quercetina (Q). Para a preparação da solução mãe, foi pesada uma quantidade de 0,05 g de quercetina e dissolvida em um balão de 50 ml, previamente calibrado com etanol. As concentrações utilizadas das soluções padrão de calibração foram obtidas por meio da mensuração dos volumes de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 ml, os quais foram diluídos em balões de 25 ml. Todos os balões volumétricos foram ajustados com etanol. Os resultados foram expressos em miligramas de AG equivalente por grama de amostra.

Atividade antioxidante pelo método DPPH. Um dos métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante foi o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), conforme descrito por Hatano et al. (1988) com algumas modificações. Para a análise, foram pipetados 0,5 mL da amostra (1 g de polpa liofilizada em 20 mL da solução extratora definida para cada ensaio do desenho experimental) foram pipetados juntamente com 2 mL de água e 2,5 mL de AlCl₃ a 2% (m/v), 0,5 mL de água e 2 mL do reagente DPPH (2.0×10^{-4} M). As soluções foram mantidas no escuro por 60 minutos e, em seguida, as absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro a 517 nm. O efeito de bloqueio do DPPH foi calculado usando equação 1, a seguir:

Equação 1: Efeito de bloqueio

$$\% \text{ Efeito de bloqueio} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Sendo A_{S} , a absorvância da solução quando o extrato da amostra foi adicionado em um nível específico, e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. O efeito bloqueio acontece quando os compostos antioxidantes presentes na amostra interagem com os radicais livres do DPPH, resultando em uma diminuição na absorção de luz pela solução. Esta

diminuição, medida espectrofotometricamente, é proporcional à capacidade antioxidante da substância em questão. A redução na absorvância é utilizada para calcular a atividade antioxidante da amostra, frequentemente expressa como IC50 (concentração do antioxidante necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%) ou como porcentagem de inibição. Um antioxidante eficaz apresenta um alto percentual de inibição do DPPH, indicando uma elevada capacidade de neutralizar radicais livres, o que contribui para a prevenção de danos oxidativos em células e tecidos. Assim, o efeito bloqueio é fundamental para a avaliação da eficácia dos antioxidantes pelo método DPPH, permitindo a quantificação da capacidade de uma substância em reduzir os radicais livres DPPH e atuar como um potencial agente antioxidante.

Para efetuar a curva de calibração utilizou-se o Trolox. Para a preparação da solução mãe, pesou 0,0064 g de Trolox para um balão de 50 ml que foi aferido com etanol. As concentrações utilizadas foram obtidas por medição dos volumes 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,3; 1 e 1,6 para balões de 10 ml, que foram aferidos com etanol. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de trolox por grama de amostra, com base em uma curva de calibração com trolox.

Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP). A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método FRAP conforme descrito por Berker et al. (2007). O reagente FRAP foi preparado combinando uma solução tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), TPTZ 10 mM [2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] e FeCl₃ 20 mM em uma proporção de 10:1:1, respectivamente. Em duplicata foram pipetados 0,5 mL de cada uma das diluições (0,5 mL dos ensaios e diluídos a 7 mL com água) das amostras (1 g de polpa liofilizada em 20 mL da solução extratora definida para cada ensaio do desenho experimental) foram pipetados juntamente com 2 mL de água e 3 mL do reagente FRAP. As soluções foram mantidas no escuro por 6 minutos e, em seguida, as absorvâncias foram medidas em um espectrofotômetro a 595 nm. As soluções padrões de ácido ascórbico foram obtidas por medição dos volumes 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 ml da solução mãe (2 mL de ácido ascórbico em 10 mL de água desionizada) para balões de 10 ml aferidos com água desionizada. Os resultados foram expressos em mg eq Fe II por grama de amostra, utilizando uma curva de calibração feita com ácido ascórbico.

2.4. Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A composição da solução aquosa da polpa da fruta da tramazeira foi analisada por HPLC. Um HPLC Varian ProStar equipado com uma bomba 220 (Varian, Inc.), um injetor manual 7725i Rheodyne, fornecido com um loop de 20 µl, um forno de coluna 7981 Jones Chromatography, com um detetor ultravioleta (UV) (Varian, modelo 9050) acoplado a um detetor de índice de refração (RI) (Varian, modelo RI-4) foi usado para separar e quantificar simultaneamente açúcares. Um fluxo de 0,6 mL/min foi aplicado numa coluna Aminex (modelo HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm), termostaticada a 45°C. Foi utilizada uma eluição isocrática, com uma fase móvel constituída por uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,0050 mol/L. O software Star Chromatography Workstation (versão 6.4., Varian Inc.) foi usado para aquisição de dados e integração de pico. Os açúcares foram detetados com o detetor UV a 210 nm. Essa metodologia foi utilizada para determinar o perfil individual de açúcares que envolve a preparação da amostra, a derivatização dos açúcares, a separação cromatográfica, a detecção e quantificação dos picos cromatográficos, e a análise dos dados. Nesse procedimento, 0,5 mL da amostra foram pipetados juntamente com diferentes concentrações de etanol (4-20%) e de solução de ácido clorídrico (3-16%). Os açúcares separados foram detectados e quantificados, comparando-se as áreas ou alturas dos picos com padrões de calibração. Os dados foram analisados estatisticamente para obter as concentrações individuais de açúcares na amostra.

Foram efetuadas várias calibrações com soluções de mistura de 4 açúcares: glucose, frutose, sacarose e sorbitol. Nas soluções padrão de calibração os níveis de concentração dos 4 açúcares variaram entre: glucose, 0,25 a 4,01 g/l; frutose, 0,26 a 4,04 g/L; 0,26 a 4,07 g/L; sorbitol, 0,26 a 4,07 g/L.

2.5. Análise de extrato por cromatografia em camada fina (TLC)

A cromatografia em camada fina é um método amplamente utilizado para separação e análise de diferentes componentes em uma amostra. As placas cromatográficas

(20x20cm) utilizadas foram de sílica gel 60 com indicador fluorescente UV₂₅₄, da Macherey-Nagel. Foi efetuado a preparação da placa traçando-se com um lápis uma linha fina na parte inferior da placa TLC, com 1,5 cm de distancia da base, sobre a placa foram também traçadas linhas com 1 cm de espaçamento entre elas, que foram utilizadas como referência para a aplicação dos pontos de amostragem, prontamente foi feita outra linha à 8,5 cm de distância da base como ponto final do arraste da fase móvel.

Com uma seringa, 5µl (1,0 g de extrato seco em 20 mL do solvente hidro-etanólico) das soluções de amostra foram cuidadosamente aplicados nos pontos marcados na linha à mesma distância. Posteriormente realizou-se uma solução de clorofórmio-metanol-acetato de etil-água (20:40:22:10, v/v) que foi introduzida na câmara cromatográfica, juntamente foi colocado um papel de filtro saturado para manter a umidade constante dentro da câmara. A placa de TLC foi então colocada dentro da câmara com o lado contendo a linha de amostra voltada para a fase móvel, a câmara foi fechada com uma tampa para garantir um ambiente controlado.

A placa foi deixada desenvolver na câmara, deu-se tempo suficiente para que os compostos se separassem e migrassem na placa. Após obter a separação desejada, a placa de TLC foi delicadamente retirada da câmara e, colocada em repouso na estufa por um período de 5 minutos, permitindo a completa dessecação. A leitura foi feita na camara ultravioleta (CN-15LL) no comprimento de onda de 365 nm.

2.6. Preparação do iogurte

A produção dos iogurtes e as suas análises foram conduzidas na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança em Portugal. O processo de produção dos iogurtes está representado fluxograma da Figura 9.

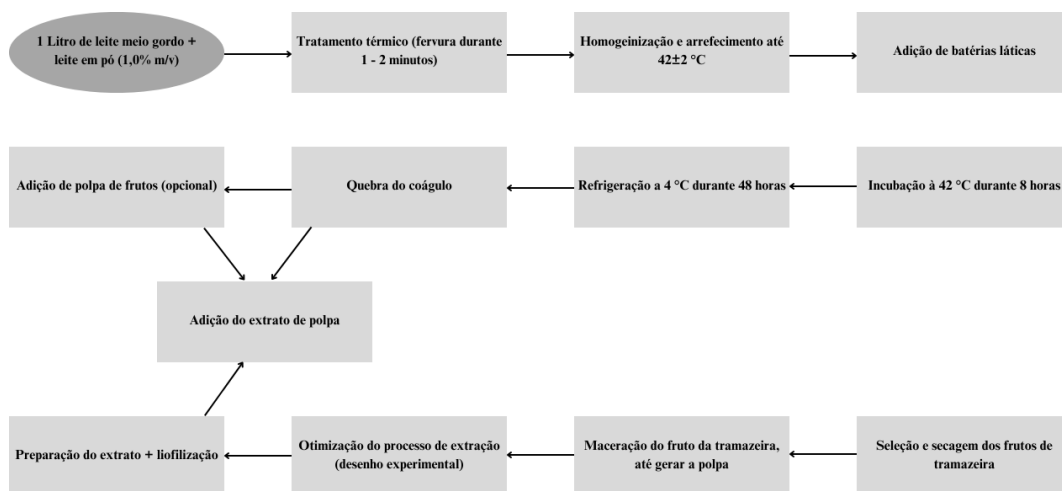


Figura 9: Fluxograma da metodologia da obtenção de iogurte enriquecido em polpa.

O iogurte produzido foi dividido em três partes para obter as seguintes amostras: (IC) Iogurte Convencional (controle), com adição de sorbato de potássio; Iogurte com incorporação do extrato do fruto da tramazeira, nas concentrações de 0,1% e 0,3%. Sendo que esses ainda foram subdivididos em três partes iguais para cada subamostra, destas subamostras ainda se dividiram em três frascos diferentes para posteriormente se realizar as análises em três tempos de armazenamento diferentes (0, 7 e 14 dias). O iogurte foi preparado no estilo "batido" usando leite meio gordo tratado em UHT (Ultra High Temperature), com a adição de 120g de iogurte natural por litro de leite.

A produção começou fervendo 1.000 ml de leite gordo UHT e, em seguida, adicionou-se leite em pó (1,0% em massa/volume). Após a fervura, as amostras foram resfriadas em banho de gelo até atingirem aproximadamente $50 \pm 2^\circ\text{C}$, momento em que o iogurte natural foi inoculado. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro herméticos com capacidade de 1.000 ml e mantidas em banho-maria a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ por 8 horas (Figura 10).



Figura 10: Produção do iogurte

Após isso, as amostras foram refrigeradas a uma temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e deixadas em repouso por um período de 24 horas. Após o término desse período, o coágulo foi rompido e a uma das amostras adicionou-se o sorbato de potássio (0,1%, m/v) e a polpa de morango pasteurizada (10,0%, m/v) a qual foi designada como iogurte convencional (IC) (adaptado de Santos, 2019).

No caso das outras amostras de iogurte com a incorporação dos extratos de tramazeira, foi adicionado a uma 0,1% e a outra 0,3% de extrato, ilustrado na Figura 11. A polpa de frutos vermelhos foi pasteurizada até atingir $50 \pm 2^\circ\text{C}$ e foi resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. As amostras foram mantidas sob refrigeração a uma temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

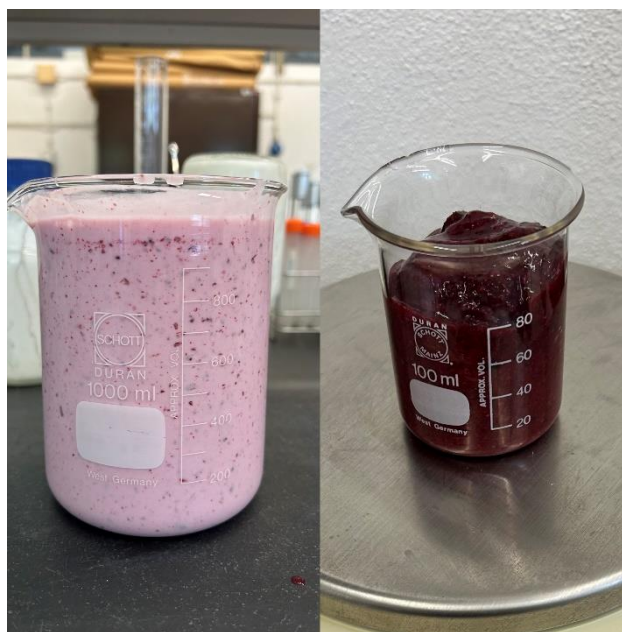


Figura 11: Adição da polpa de morango no iogurte.

2.7. Análises microbiológicas no iogurte

Preparação das amostras. Para avaliar o perfil microbiológico, as amostras de iogurte foram preparadas e armazenadas em recipientes estéreis, em seguida, foram homogeneizadas com um bastão de vidro previamente esterilizado. Uma porção de 10 ml do iogurte foi transferida para um frasco também estéril, ao qual foram adicionados 90 ml de uma solução de Ringer esterilizada, agitou-se a mistura e resultou na solução mãe (Figura 12). Posteriormente, transferiu-se 1 mililitro dessa primeira diluição para tubos estéreis contendo 9 ml de um solvente apropriado, para criar a diluição 10^{-1} . Esse processo foi repetido até obter a diluição adequada para cada análise microbiológica específica. Assegurou-se uma boa mistura dos conteúdos dos frascos e, posteriormente, alíquotas das diluições resultantes foram espalhadas em diferentes meios de cultura. Isso foi feito para permitir a pesquisa e contagem de diferentes grupos de microrganismos, incluindo contagem total de bolores e leveduras, contagem total de bactérias lácticas, contagem total de aeróbios mesófilos totais, contagem total de *Escherichia coli*/Coliformes totais e contagem total de *Staphylococcus aureus*. As análises foram efetuadas todas em duplicatas.



Figura 12: Solução de ringer, solução mãe 10^0 .

Contagem total de bolores e leveduras. Para a contagem total de bolores e leveduras, utilizou-se o meio Rose Bengal CAF Agar da Liofilchem, Itália. A análise foi conduzida segundo o estipulado pela norma ISO 21527-2:2008. O procedimento analítico foi realizado em duplicata, consistindo na inoculação de 0,1 mL das diluições de 10^{-1} a 10^{-2} . As placas de Petri contendo as amostras foram então incubadas a 25°C , durante um período de 48 horas para a contagem das leveduras e 5 dias para a contagem dos bolores (Figura 13).

Pesquisa e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*. Para realizar a pesquisa e quantificação de Coliformes a 37°C e *Escherichia coli*, utilizamos o kit SimPlate da Biocontrol® (conforme representado na Figura 14) em conformidade com o método AOAC 2005.03. O meio desidratado fornecido pelo fornecedor foi reconstituído usando 100 ml de água destilada estéril, conforme as instruções fornecidas pelo fabricante.

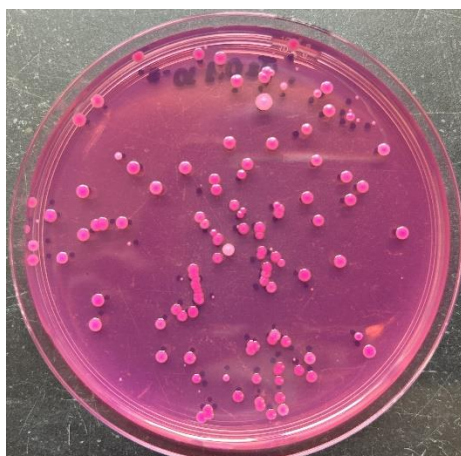


Figura 13: Placa de petri para análise de Bolores e Leveduras.

Subsequentemente, 9 ml do meio reconstituído foram pipetados em um tubo de ensaio estéril, ao qual acrescentamos 1 ml das diluições da amostra (10^{-1} e 10^{-2}). O conteúdo dos tubos de ensaio foi então cuidadosamente transferido para a placa Simplate, preenchendo os 84 poços através de movimentos circulares, sendo o excesso de líquido descartado na esponja adjacente. As placas foram colocadas em incubação a 37°C por um período de 24 a 48 horas.

A quantificação dos coliformes foi realizada através da contagem dos poços que apresentaram alteração na coloração do meio, enquanto a presença e quantificação de *E. coli* foi efetuada pela observação de fluorescência nos poços quando expostos à luz ultravioleta (UV) a 365 nm.

O número de coliformes totais e *E. coli* foi calculada com base numa tabela de conversão fornecida pelo fabricante do kit SimPlate. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra (UFC/g).

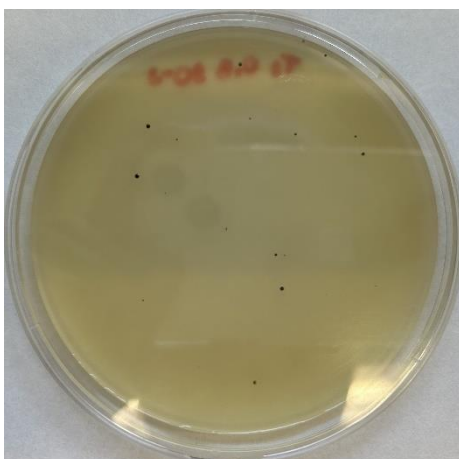


Figura 15: Placa de petri para análise de *Staphylococcus aureus*.

Após a verificação das colônias previamente designadas, procedeu-se ao cálculo do número de colônias de *Staphylococcus coagulase* positiva presentes em cada placa de petri onde houve contagem de colônias, empregando-se a seguinte fórmula:

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times C^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times C^{nc}$$

Equação 2: Contagem de colônias de *Estafilococos coagulase* positiva.

b^c - número de colônias características que se revelaram coagulase positiva

b^{nc} - número de colônias não características com resultado coagulase positiva

C^c - número total de colônias características contabilizadas na placa

C^{nc} - número total de colônias não características contabilizadas na placa

A^c - número de colônias características submetidas ao teste da coagulase

A^{nc} - número de colônias não características submetidas ao teste da coagulase

Contagem total de aeróbicos mesófilos totais. Para efetuar a contagem de mesófilos totais, utilizamos o meio de cultura conhecido como Plate Count Agar (PCA) ou Agar Padrão para contagem, utilizando o método de incorporação do inóculo. O procedimento foi iniciado ao adicionar, em duplicata, uma amostra de 1 mililitro de cada diluição das amostras em placas de Petri previamente esterilizadas. Em seguida, foram adicionados de 15 a 20 mililitros do meio PCA em cada placa, e realizam-se movimentos circulares para garantir uma distribuição uniforme da amostra no meio. Após a completa solidificação

do meio, as placas foram incubadas em uma estufa a uma temperatura de 30°C, por um período de 48 a 72 horas. Após esse período, procedemos à contagem das colônias presentes nas placas (Figura 16). Os resultados obtidos foram expressos em termos de Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra (UFC/g).

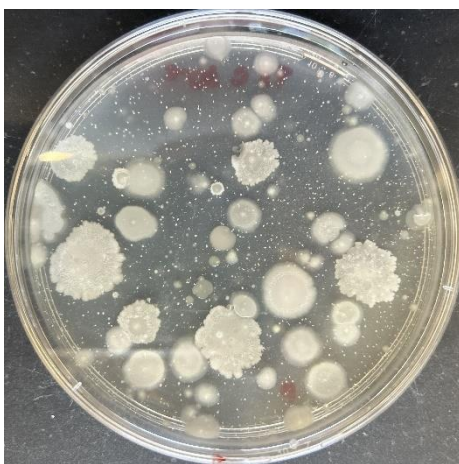


Figura 16: Placa de petri para análise de Mesófilos Totais.

Contagem de bactérias lácticas. A determinação da quantidade de bactérias lácticas foi realizada conforme descrito por Ferreira et al., 2019, seguindo o método que envolve a imersão da amostra em uma dupla camada de Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe). As placas foram incubadas a 30°C por um período de 72 horas, como ilustrado na Figura 17.

Para realizar este procedimento, inicialmente, pipetamos 1 mililitro de cada amostra em placas de Petri previamente esterilizadas, em duplicata. Em seguida, adicionamos aproximadamente 10 mililitros do meio MRS a cada placa e realizamos movimentos circulares para promover a completa mistura. Aguardamos o tempo necessário para que o meio solidificasse e, então, adicionamos uma segunda camada do meio MRS. Após a solidificação completa do meio, cobrimos as placas de Petri com parafilm e as colocamos em incubação invertida na estufa, garantindo assim condições adequadas para o crescimento das bactérias lácticas.



Figura 17: Placa de petri para análise de Bactérias Lácticas.

Para determinar o número de bolores e leveduras, contagem total de microrganismos aeróbios totais e bactérias lácticas efetuou-se o cálculo da contagem de microrganismos de acordo com a ISO 6222:1999 e ISO 4833:2003 (com exceção dos *Staphylococcus aureus*, cuja o cálculo do número de colônias está referido anteriormente). Ou seja, após o tempo de incubação previstos para cada análise, realizou-se a contagem das colônias em UFC por grama de amostra, utilizando a seguinte fórmula:

$$UFC/g = \Sigma c / [V \times (n1 + 0,1 n2) \times d]$$

Equação 3: Contagem de Microrganismos de cada amostra

Σc - soma das colónias em todas as placas contadas;

V- volume de inóculo semeado em cada placa;

n1- número de placas da primeira diluição contada;

n2- número de placas da segunda diluição contada;

d- diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens.

2.8. Análises físico-químicas no iogurte

A fim de investigar as propriedades físico-químicas do iogurte com extrato do fruto da Tramazeira, foram efetuadas avaliações que compreenderam a determinação da

atividade de água (aw) e do pH, realizadas em duplicata e avaliadas nos períodos de 0, 7 e 14 dias.

Determinação do pH. O pH das amostras de iogurtes foi determinado por meio de um potenciômetro (Mettler Toledo), devidamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,00 e 7,00. A solução foi agitada para assegurar a uniformidade da suspensão das partículas, sendo posteriormente posicionadas para sua medição. Prontamente, o potenciômetro foi imerso diretamente nas amostras para a determinação do pH.

Atividade da água (aw). A determinação do valor de atividade de água (aw) foi conduzida por meio de um higrômetro (Aqualab 4TE Decagon, EUA) (Figura 18). Uma hora antes de iniciar a análise, o instrumento foi ativado para permitir a sua estabilização. Em seguida, procedeu-se à calibração utilizando água destilada à temperatura ambiente. Após a confirmação da calibração, a amostra homogeneizada foi posicionada no recipiente apropriado de polietileno e, posteriormente, inserida no aparelho para a subsequente leitura do valor de atividade de água.



Figura 18: Medidor de aw (Aqualab 4TE Decagon, USA) utilizado.

Determinação dos compostos bioativos e das propriedades biológicas do iogurte. Na preparação dos extratos hidroetanólicos do iogurte, inicialmente, as amostras foram submetidas à liofilização. Posteriormente, 1 g de cada amostra de iogurte liofilizada foi meticulosamente pesado e adicionado a 25 mL da solução hidroetanólica. A mistura foi

agitada por um período de 1 hora e, em seguida, sofreu filtração usando papel de filtro plano da marca PRAT DUMAS com diâmetro de 150 mm e posteriormente, o filtrado foi submetido ao evaporador rotativo (IKA RV8) a uma temperatura de banho de 50°C. O extrato resultante foi então dissolvido em 10 mL da solução hidroetanólica (figura 19). A avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP foi conduzida utilizando a solução mãe dos extratos do fruto de tramazeira. Por outro lado, para o método de DPPH, foi necessário realizar uma diluição, na qual 1 mL da solução mãe foi transferido para um balão de 25 mL. Quanto à determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides, a diluição consistiu em 1 mL da solução mãe em um balão de 10 mL. Todas as análises foram realizadas de acordo com as metodologias reportadas anteriormente.



Figura 19: a preparação dos extratos de iogurte.

2.9. Aceitação sensorial e intenção de compra

A avaliação sensorial do iogurte contendo extrato do fruto da Tramazeira e do iogurte produzido com sorbato, foi conduzida com a participação de 50 indivíduos não treinados, residentes na cidade de Bragança, pertencentes à região Norte e ao distrito de Bragança. O procedimento empregado consistiu na aplicação de um teste de aceitação no laboratório de microbiologia no Instituto Politécnico de Bragança. Os participantes foram orientados a preencher um formulário online que foi disponibilizado através de um QR Code, sendo

incentivados a expressar seu grau de apreciação para cada amostra mediante uma escala hedônica estruturada de 5 pontos. Os extremos dessa escala variavam entre "gostei extremamente" e "desgostei extremamente", enquanto o escore 2 denotava "eu não gostei", o escore 3 indicava "indiferente", e o escore 4 correspondia a "gostei". As amostras foram colocadas aleatoriamente em copos descartáveis de 50 mL, previamente codificados com números aleatórios de três dígitos, associados às distintas condições de iogurte (com extrato do fruto da Tramazeira e controlo). Cada participante foi direcionado para sua respectiva posição, e as amostras refrigeradas foram distribuídas em grupos de 5 consumidores de cada vez. No mesmo formulário de avaliação, foram atribuídas pontuações para os atributos de aparência, aroma, consistência e sabor. Além disso, uma folha de teste específica, contendo uma escala estruturada de 5 pontos, foi utilizada para avaliar a intenção de compra, variando entre "eu certamente compraria" e "eu certamente não compraria".

O Índice de Aceitabilidade (IA) foi calculado pela equação descrita por Castro et al. (2007), Equação 2:

Equação 4: Índice de aceitabilidade (IA)

$$\%AI = A \times 100/B$$

onde A = pontuação média do produto e B = pontuação máxima atribuída ao produto.

2.10. Tratamento estatístico

A ANOVA de dois fatores foi utilizada para verificar a influência da concentração do extrato do fruto de Tramazeira (fator 1) e dos dias de armazenamento (fator 2), bem como o efeito da interação entre eles nos parâmetros químicos (variáveis dependentes; FRAP, DPPH, FLAV e CFT). O modelo de ANOVA foi avaliado quanto à sua significância (considerando o nível de significância de 0,05) e seu coeficiente de determinação (R²; permite verificar a percentagem de explicação da variabilidade original dos dados experimentais pelo modelo).

O pressuposto de normalidade foi verificado analisando os resíduos do modelo com o teste de Shapiro-Wilk e, para a suposição de homogeneidade de variâncias, com o teste de Levene, menos sensível a desvios da normalidade. Para variáveis dependentes com problemas de normalidade ou falta de homogeneidade de variâncias, foi utilizada uma MANOVA não paramétrica baseada em permutações (frequentemente chamada de PERMANOVA, análise de variância multivariada baseada em distâncias e permutações). Ela depende de dissimilaridades para comparar grupos, de maneira semelhante à ANOVA, e é amplamente insensível à heterogeneidade em desenhos equilibrados. A PERMANOVA utiliza permutações para calcular as estatísticas F (pseudo-F) e a hipótese nula era que os grupos não diferem no espaço multivariado de dispersão ou posição (Anderson, 2014).

O software R, de código aberto, versão R 4.2.2 GUI 1.79 High Sierra build (Mac OS), foi utilizado para a análise de dados. As bibliotecas utilizadas foram “vegano” (Oksanen, 2022), que permitiu a aplicação da PERMANOVA, e “stats” (Team, 2013), que permitiu a aplicação da ANOVA e dos testes para avaliar as suposições da ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise de açúcares por HPLC

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar diferentes amostras de extrato de tramazeira, focando na composição em açúcares, compostos fenólicos e antioxidantes. A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, revelando a presença de glucose, frutose, sorbitol e sacarose. A glucose e a frutose, principais monossacarídeos nas frutas, foram encontradas em maior quantidade, com a glucose predominando sobre a frutose, seguidas pelo sorbitol e a sacarose.

A adição de frutas ao iogurte não só altera suas características organolépticas, tornando-o mais atrativo, mas também enriquece o produto com compostos antioxidantes. Estes compostos são benéficos ao organismo, ajudando no fortalecimento do sistema imunológico e no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo. No entanto, os benefícios à saúde proporcionados pelo iogurte dependem da quantidade consumida e da biodisponibilidade dos compostos presentes.

Na Figura 20 apresenta-se um exemplo do cromatograma típico da análise dos 4 açúcares que foi obtido para os níveis de concentração: 1,032 g/L; sacarose, glucose, 1,016 g/L; frutose, 1,025 g/L; sorbitol, 1,031 g/L.

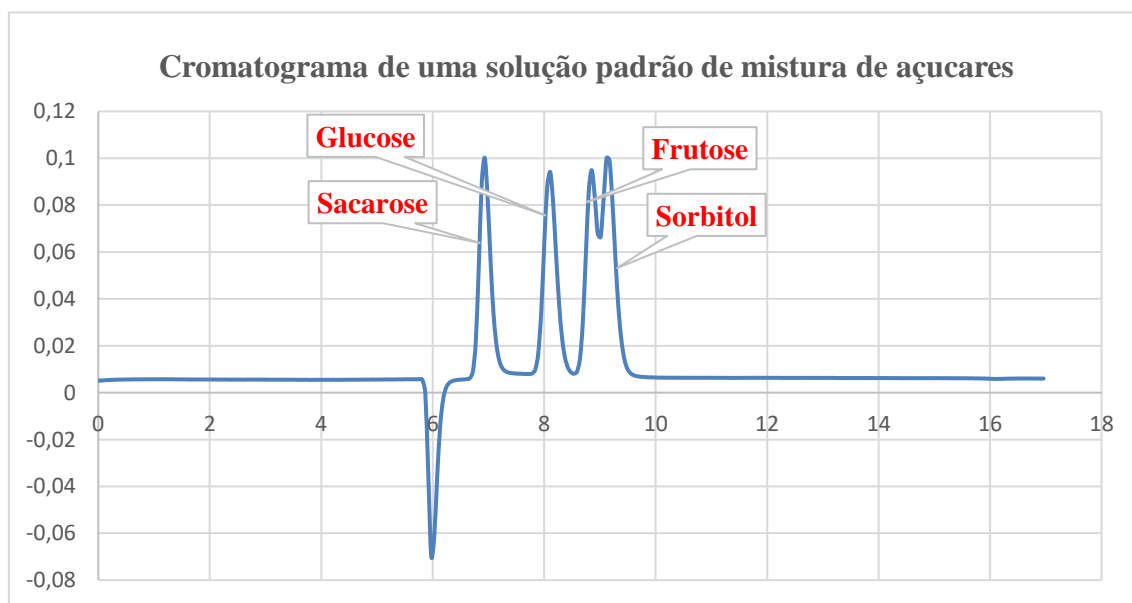


Figura 20: Exemplo do cromatograma obtido da análise de uma solução padrão de mistura dos 4 açúcares.

Na Tabela 4 estão representados os valores calculados da regressão linear entre o sinal (área do pico) obtido dos cromatogramas da análise e as concentrações das soluções padrão de mistura dos 4 açúcares analisados. Também se apresentam os valores dos limites de detecção e quantificação (valores aproximados) calculados usando os resultados da regressão linear através das equações:

Limite de detecção = $3,3 \times$ erro da ordenada na origem / declive da reta

Limite de quantificação = $10 \times$ erro da ordenada na origem / declive da reta

As calibrações obtidas são aceitáveis com coeficientes de correlação superiores a 0,998, indicando que os pontos experimentais estão próximos da reta ajustada. Na análise de glucose e sacarose obtiveram-se os valores mais baixos devido ao nível mais alto de concentração sair ligeiramente da tendência linear dos restantes, como se pode visualizar na Figura 21 (calibração obtida para a glucose). Os declives da calibração são semelhantes mostrando que a coluna de HPLC usada tem um desempenho semelhante para os 4 açúcares.

Tabela 4: Parâmetros das calibrações por HPLC

Variável	Glucose	Frutose	Sacarose	Sorbitol
a	1712845.3	1446889.3	1607005.3	1833391.3
b	-191160.1	-148145.6	-199258.8	-199276.7
R	0.998	0.9992	0.998	0.9992
LD (g/L)	0.214	0.158	0.237	0.160
LQ (g/L)	0.647	0.480	0.718	0.485

a – declive; b – ordenada na origem; R – coeficiente de correlação; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação.

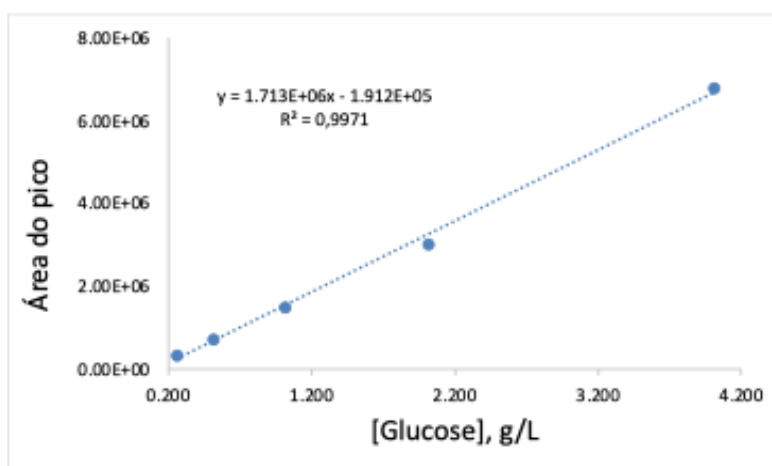


Figura 21: Calibração da glucose por HPLC

Em relação aos limites de detecção e quantificação calculados foram mais elevados para a glucose e sacarose, convém referir que os resultados das respectivas estatísticas da regressão linear apresentaram maiores erros (coeficientes de correlação mais baixos). De acordo com Mikulic-Petkovsek et al., (2017), no que diz respeito ao conteúdo de açúcar em frutos de genótipos de sorveira, a glucose foi o açúcar presente na maior concentração (36,11-48,45%), seguido pela frutose (25,82-39,56%), sorbitol (18,25-27,18%) e sacarose (1,04-2,87). Estes resultados corroboram os observados neste trabalho, segundo esses investigadores os teores de açúcares diferiram estatisticamente entre os genótipos, exceto para sacarose. O sorbitol é mais benéfico do que outros açúcares em relação ao controle da dieta, saúde dental e para evitar problemas gastrointestinais, podendo ser utilizado como substituto da glicose (FORNI et al., 1992). Como reportado anteriormente, Mikulic-Petkovsek et al. (2017) relatou teores de sorbitol entre 26,83-27,80% em frutas de cultivares de sorveira cultivadas na República Tcheca. No nosso estudo, de acordo com o referido na literatura, destaca-se o teor de sorbitol e a concentração reduzida de sacarose.

3.2. Amostras da fruta da Tramazeira

As amostras da fruta da Tramazeira recolhidas no Inverno de 2022 (agosto, setembro, outubro e novembro) apresentaram resultados semelhantes de conteúdo em água. De

forma geral, no período de outubro e novembro, 354 g de fruta permitem obter aproximadamente 140 g de polpa (47,4% do fruto) e 42 g de polpa liofilizada (13,8 % do fruto). A polpa contém cerca de 70,8% de água. Na análise dos açúcares por HPLC apenas se verificou a presença de sacarose e frutose nas amostras recolhidas em agosto e setembro. Os níveis de glucose mantiveram-se aproximadamente constantes nos quatro meses (variaram entre 15,9 e 17,9 g/L) mas, os teores de sorbitol foram praticamente idênticas e mais elevadas nas amostras recolhidas no mês de setembro (92,8 g/L), os valores mais baixos observaram-se no mês de agosto (61,7 g/L), tendo-se mantido aproximadamente semelhante nos meses de outubro e novembro (83,3 e 91,7 g/L, respetivamente).

Todos os ensaios a seguir apresentados foram realizados com a polpa da Tramazeira recolhida em outubro/novembro.

3.3. Optimização do extrator hidro-etanólico

O trabalho foi conduzido com o propósito de otimizar o processo de extração de compostos fenólicos, estando o desenho experimental descrito na secção 2.2. Na Tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos da análise de TPC, DPPH, FRAP e açúcares por HPLC, referentes aos 14 ensaios do desenho experimental efetuados para o estudo da optimização da composição da solução extratora hidro-etanólica. Verificou-se que a sacarose não foi detectada em qualquer um dos extratos.

Os níveis de compostos fenólicos totais variaram entre no intervalo de 40 a 65 mg por g de polpa liofilizada, tendo-se obtido um valor médio de 56 mg por g de polpa liofilizada. Ao nível das atividades antioxidantes, em média, a % de inibição pelo método DPPH foi de 83% e, pelo método FRAP, de 0,43 mg de FeCl₃ por g de polpa liofilizada. Os resultados dos açúcares mostram que a frutose esteve presente nos extratos em concentrações superiores às da glucose (em média, 27 mg de frutose por g de polpa liofilizada e 22 mg de glucose por g de polpa liofilizada), em média, 1,21 vezes superior. Também se observou que o sorbitol foi o açúcar mais abundante (presente com a concentração média de 95 mg de sorbitol por g de polpa liofilizada), em média, 3,51 vezes maior à da frutose (Tabela 5).

Tabela 5: desenho experimental de otimização da solução extratora hidro-etanólica

Nº do ensaio	pH	Etanol%	TPC mg/g	DPPH % inibição	FRAP mg/g	Glucose mg/g	Frutose mg/g	Sorbitol mg/g
11	0,94	60	63,6	90,2	0,428	24,8	30,7	102,3
5	1,67	35	40,1	64,7	0,477	16,4	18,1	70,9
7	1,67	85	53,9	82,7	0,334	23,3	25,7	98,5
1	3,1	60	61,7	83,5	0,529	23,4	29,3	93,5
2	3,1	60	65,0	88,4	0,490	22,5	28,1	93,9
4	3,1	60	61,3	88,6	0,476	25,5	29,6	104,8
8	3,1	60	58,1	91,5	0,471	24,8	28,8	105,5
13	3,1	60	58,1	92,0	0,518	21,9	28,1	92,7
14	3,1	60	58,4	92,3	0,522	20,7	29,3	98,4
9	3,1	24	47,4	81,4	0,318	20,2	22,9	87,7
10	3,1	95,4	48,2	63,6	0,383	18,9	23,8	84,4
3	4,05	85	47,2	74,2	0,331	25,5	30,7	101,5
6	4,05	35	65,0	82,6	0,530	23,6	27,8	100,9
12	4,88	60	57,2	83,9	0,253	21,8	25,6	93,3

Nos vários modelos RSM obtidos, referentes ao ajuste polinomial dos valores das diferentes respostas analisadas em relação aos níveis experimentais que foram definidos para os dois fatores em estudo (ver Tabela 4 na secção 2.2), o termo da constante não foi significativo (valor de $p > 0.10$) e, por isso, não foi considerado no modelo final.

Para os dados de TPC, o modelo final obtido foi significativo (valor de $p < 0,001$) e permitiu justificar 99,3% da variabilidade dos dados. O modelo mostra significância nos termos de % Etanol, interação pH:%Etanol e pH quadrático:

$$\text{TPC} = 7,59*\text{pH} + 0,25* \% \text{Etanol} - 0,083*\text{pH}:\% \text{Etanol} - 0,42*\text{pH}^2.$$

O modelo RSM para os valores obtidos da atividade antioxidante pelo método DPPH foi significativo (valor de $p < 0,001$ e explicou 99,6% da variância dos dados. O modelo obtido foi:

$$\text{DPPH} = 24,1*\text{pH} + 2,19* \% \text{Etanol} - 0,15*\text{pH}:\% \text{Etanol} - 2,08*\text{pH}^2 + 0,017* \% \text{Etanol}^2.$$

No caso da avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP, o modelo RSM permitiu explicar 98,8% da variabilidade dos dados experimentais (modelo significativo; valor de $p < 0,001$) e mostrou significância no termos pH, %Etanol, interação pH:%Etanol, pH quadrático e %Etanol quadrático:

$$\text{FRAP} = 171 * \text{pH} - 6,45 * \% \text{Etanol} - 0,76 * \text{pH} : \% \text{Etanol} - 18,6 * \text{pH}^2 + 0,11 * \% \text{Etanol}^2.$$

Em relação aos resultados da análise dos açúcares por HPLC, os modelos RSM mostraram serem significativos (valor de $p < 0,001$) e apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,980 (mais 98% da variabilidade dos dados é explicada pelos modelos). Para os três açúcares (glucose, frutose e sorbitol), os modelos mostraram estarem dependentes somente do fator %Etanol e do respectivo termo quadrático (termo significativo ao alfa 0,05) e do termo da interação (termo significativo ao alfa 0,10):

$$\text{GLU} = 0,028 * \text{pH} + 0,022 * \% \text{Etanol} - 0,0017 * \text{pH} : \% \text{Etanol} - 0,00014 * \% \text{Etanol}^2$$

$$\text{FRU} = 0,073 * \text{pH} + 0,023 * \% \text{Etanol} - 0,0015 * \text{pH} : \% \text{Etanol} - 0,00016 * \% \text{Etanol}^2$$

$$\text{SOR} = - 0,035 * \text{pH} + 0,10 * \% \text{Etanol} - 0,0074 * \text{pH} : \% \text{Etanol} - 0,00072 * \% \text{Etanol}^2$$

Os gráficos bidimensionais de superfície referentes aos modelos RSM obtidos estão apresentados nas Figura 23. Da avaliação dos resultados globais, a solução ótima de extrato hidroetanólico foi selecionada de forma que a extração fosse representativa em compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides): pH 4,9 e Etanol 40%. Este ponto ótimo (Figura 22), corresponde a um alto teor de compostos fenólicos totais (TPC), capacidade antioxidante (método DPPH) e açúcares, assim como, um baixo valor de FRAP. Na figura, o ponto marcado com um X indica a localização do ponto ótimo de extração, destacando onde se obtêm os melhores resultados em termos de compostos fenólicos totais.

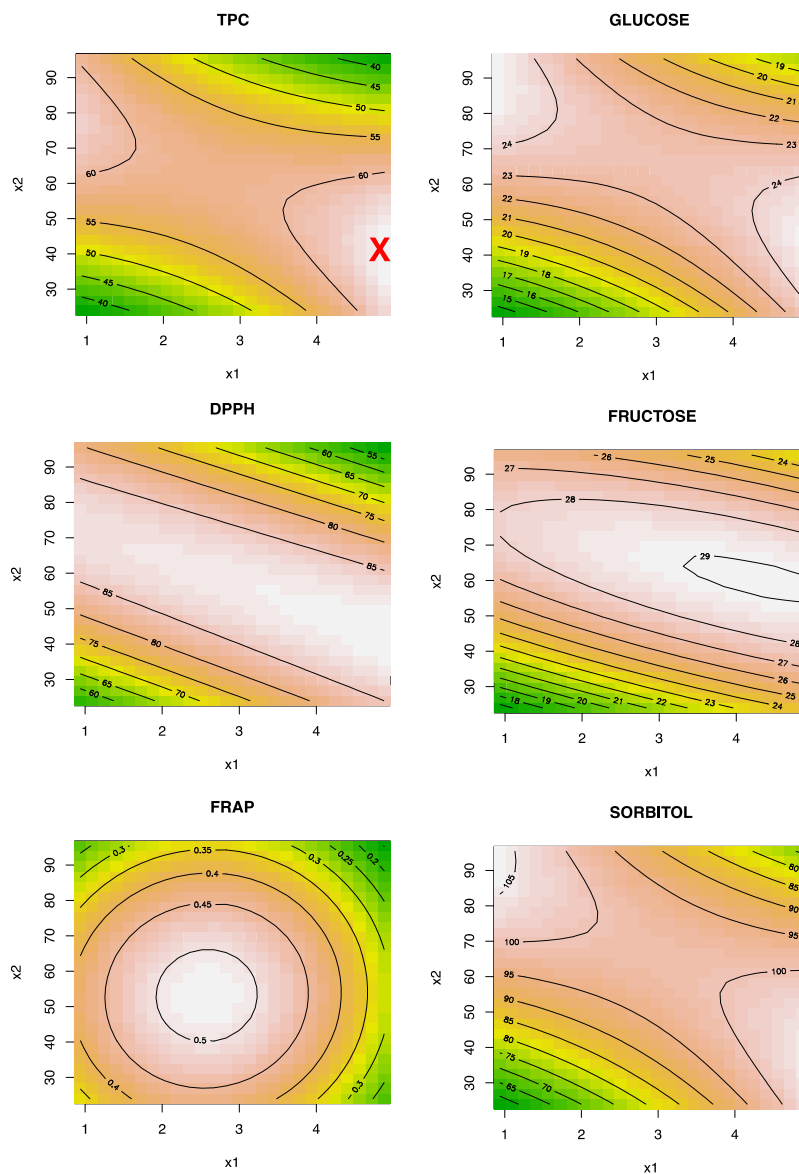


Figura 22: Modelos de RSM (metodologia de superfície de resposta).

3.4. Análise por cromatografia em camada fina (TLC)

A técnica TLC foi aplicada para analisar as soluções hidro-etanólicas preparadas segundo o desenho experimental definido para a otimização da extração dos compostos fenólicos. A Figura 23 representa a fotografia obtida no TLC com a visualização à radiação de comprimento de onda a 365 nm. A imagem fotográfica mostra um perfil de manchas semelhante entre os diferentes ensaios efetuados. Considerando os resultados

apresentados na secção anterior, que mostram diferenças na composição fenólica e nas propriedades biológicas, infere-se que os compostos fenólicos extraídos devem diferir principalmente nos níveis de concentração.

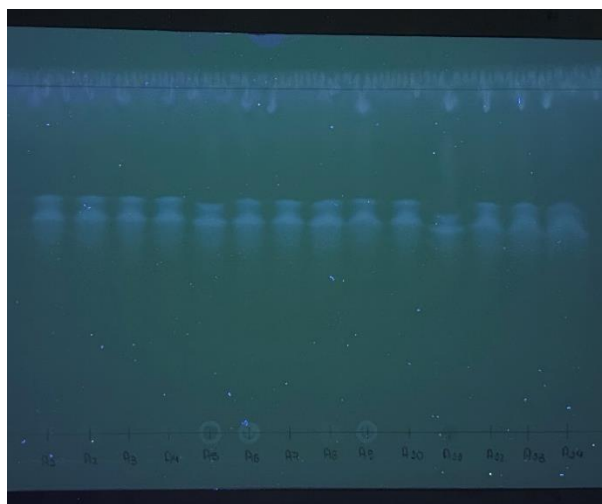


Figura 23: Leitura da placa de TLC.

3.5. Análises no iogurte

3.5.1. Análises físico-químicas

Na Tabela 6 estão sumariados os resultados obtidos para os parâmetros pH e aW para as amostras dos dois tipos de iogurte em estudo (iogurte convencional e iogurte com extrato de tramazeira). Segundo Oliveira et al., 2022, o pH é um requisito importante, a ser avaliado uma vez que afeta a atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer a um determinado grupo em detrimento de outro. No caso da fermentação do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus*.

Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas do iogurte

Iogurte	pH	aW
Convencional (sorbato de potássio)	3.90	0.9891
Com extrato de Tramazeira (0,1%)	3.97	0.9885

Os valores de pH nos dois diferentes iogurtes não apresentaram diferença, sendo os valores de 3,90 e 3,97, respectivamente, para o iogurte controle e para o iogurte adicionado de extrato. Os nossos valores corroboram os obtidos por Giese, et al. (2010) , que oscilaram entre 3,83 e 4,01 para iogurtes de morango e, os encontrados por Castro et al. (2013), que variaram entre 3,83 e 4,6, para iogurtes naturais, contudo todas as amostras se encontravam abaixo do limite de 4,6 considerado ideal na produção de iogurte (Quintino, 2012). Para Silva et al. (2012), o iogurte com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$), favorece a separação do soro, porque o gel não se forma regularmente, por outro lado, a valores de $\text{pH} < 4,0$, ocorre a diminuição do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, ocasionando não conformidade ao produto. Neste contexto, infere-se que a adição de extrato de tramazeira não afetou a composição físico-química das amostras de iogurte. Fonseca et al. (2014) acreditam que produzir um iogurte com adição de um novo ingrediente ou aditivo, pode preservar a estabilidade e a viabilidade das bactérias lácticas ao longo do tempo de vida de prateleira.

Em relação a atividade de água (aW), de acordo com Arévalo-Pinedo et al., (2022), atividade de água para o iogurte adicionado de geleia de hibisco, não apresentou diferença significativa entre as amostras, observaram valores que variaram de 0,97 e 0,98, sendo um valor próximo ao encontrado nesta pesquisa. Segundo Santos et al. (2016) os valores de atividade de água podem variar de 0 a 1, sendo os valores encontrados neste estudo considerados elevados. Santos et al. (2016), encontraram para a amostra do iogurte in natura um valor de atividade de água de 0,96, sendo este valor um pouco abaixo do encontrado no presente estudo. Também foi constatado por Silva et al. (2020), um valor de atividade de água de 0,98 (Iogurte tipo grego natural), diferindo das outras duas formulações de iogurte tipo grego adicionado de diferentes concentrações de geleia extra de pitanga que apresentaram o mesmo valor de 0,97, sendo esses valores condizentes com os obtidos nesse estudo. Resultados semelhantes também foram encontrados por Marinho et al. (2012), que reportou valores em torno de 0,96 a 0,97.

3.5.2. Composição fenólica e atividades biológicas

A análise dos resultados obtidos para as propriedades químicas, FRAP, DPPH, flavonoides totais (FLAV) e compostos fenólicos totais (TPC), considerando o desenho experimental para a avaliação do efeito de 0,1% e 0,3% de extrato do fruto da tramazeira no iogurte (fator 1) e do efeito do tempo de armazenagem do iogurte (0, 7 e 14 dias) foram avaliados por ANOVA de dois fatores, com interação. Na Tabela 7 apresentam-se os resultados da avaliação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, bem como, das estatísticas do modelo ANOVA obtido e do valor de p para o termo de interação. A tabela mostra que somente as variáveis FRAP, DPPH e TPC permitiram obter modelos significativos ($R^2 > 0,81$ e valor de $p < 0,05$). Os valores de R^2 indicam que os modelos de ANOVA explicam mais de 81% da variabilidade nos dados experimentais. O termo de interação entre a percentagem de extrato do fruto da Tramazeira no iogurte (fator 1) e o tempo de armazenagem (fator 2) foi significativo para as variáveis FRAP e TPC.

Tabela 7: Resultados da ANOVA para as análises químicas.

Variáveis	Modelo		Termo de interação		Teste SW	Teste Levene
	R^2	RSE	Valor de p	p-value	p-value	p-value
FRAP	0.998	0.003	< 0.001	< 0.001	0.700	< 0.001
DPPH	0.814	0.007	0,014	0,318	0.250	< 0.001
FLAV	0.199	0.011	0,957	0,956	0.899	< 0.001
TPC	0.868	0.001	0.004	0,014	0,031	< 0.001

R^2 - Coeficiente de determinação; RSE - Erro padrão residual; FRAP - Poder Antioxidante Redutor Férrico; DPPH - 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate; FLAV – Flavonoides; TPC – Compostos fenólicos totais; Teste SW – Teste Shapiro-Wilk.

No entanto, todos os resultados demonstraram problemas de normalidade (valor de p do teste Shapiro-Wilk $< 0,05$) e/ou homogeneidade de variâncias (valor de p do teste de Levene < 0.001 em todas as variáveis dependentes). Neste contexto, a PERMANOVA foi também utilizada para confirmar a significância dos termos de interação. Os resultados reforçaram ainda mais a ideia de que os dados de FRAP, DPPH e TPC devem ser

interpretados usando os seguintes gráficos (valores de p dos termos de interação foram significativos).

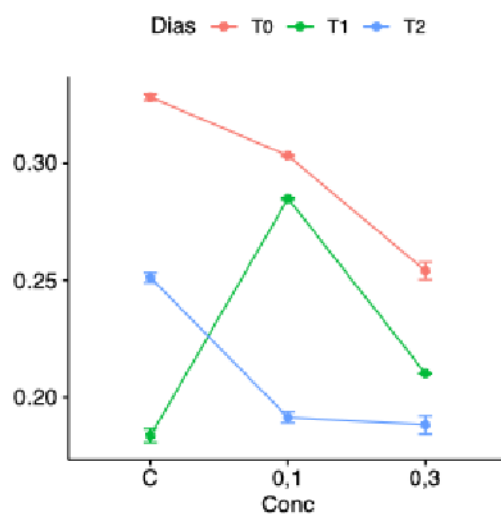


Figura 24: Anova FRAP

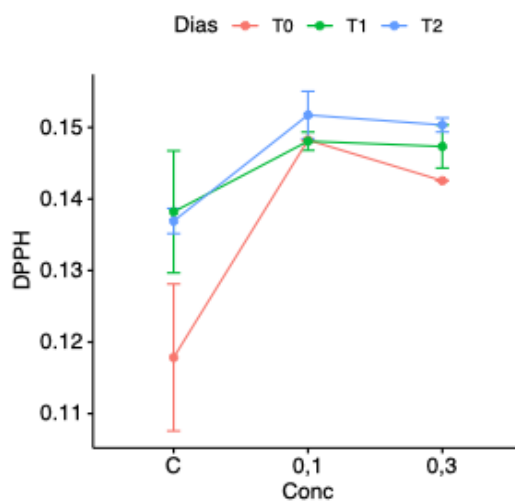


Figura 25: Anova DPPH

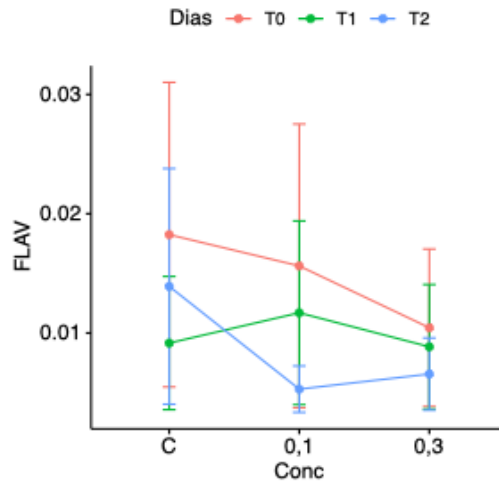


Figura 26: Anova FLAV

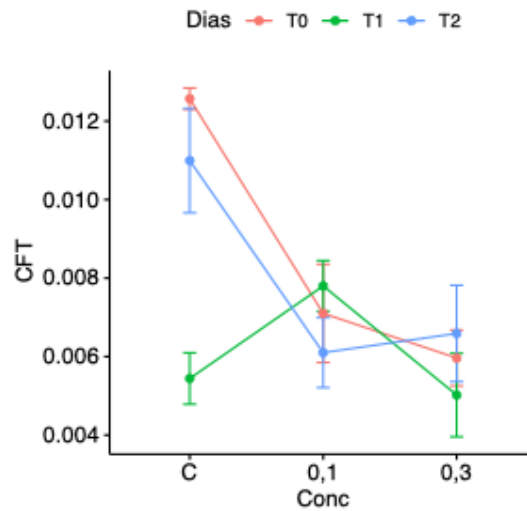


Figura 27: Anova TPC

A análise dos dados apresentados na Figura 24 para os resultados da capacidade antioxidante avaliadas pelo método FRAP do grupo de controle para o ensaio T1 exibiu uma significativa diminuição, destoando da tendência observada nos demais ensaios. Este ensaio repetido teve uma precisão aceitável (desvio padrão relativo percentual de 2,3%) o que é indicativo que algo ocorreu na preparação ou análise deste controle. No global, constata-se que o valor de atividade antioxidante aumenta de forma consistente à medida que as percentagens de extrato aumentam, de 0,1% para 0,3% de extrato, no iogurte, associado a uma redução proporcional conforme o aumento do tempo de armazenagem.

No que concerne à Figura 25, observa-se, de maneira geral, um crescimento notável no valor de atividade antioxidante determinado pelo método DPPH entre o grupo de controle e as concentrações de 0,1% e 0,3% de extrato no iogurte (valores com $p < 0,05$). Entre os níveis de percentagem de 0,1% e 0,3% de extrato no iogurte, verificou-se que os resultados são estatisticamente iguais. Adicionalmente, os dados obtidos para diferentes tempos de armazenagem também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Entretanto, os resultados referentes dos flavonoides totais (FLAV), conforme evidenciado na Figura 26, apresentaram variações acentuadas em cada ensaio, impedindo uma análise das diferenças entre os vários ensaios do desenho experimental. Em outras palavras, a considerável variabilidade dos dados inviabilizou a obtenção de um modelo de ANOVA significativo, invalidando qualquer análise adicional. Considera-se que estes resultados tiveram origem no procedimento analítico onde se verificou que o reagente $FeCl_3$ não estava em perfeitas condições. De realçar, que foram efetuadas várias tentativas de obter resultados exatos e precisos com diferentes reagentes de $FeCl_3$ (marcas e origem de laboratórios diferentes) mas, todos mostraram estar fora de validade o que se traduziu na realização destes ensaios.

Os resultados de compostos fenólicos totais (TPC) apresentados na Figura 27, mais uma vez, mostram uma tendência discrepante no grupo de controle do iogurte para o tempo de armazenagem T1. Devido a este resultado, o termo de interação revelou-se significativo. De maneira geral, os níveis de TPC demonstram similaridade e diminuem de forma acentuada do grupo de controle para a concentração de 0,1% de extrato no iogurte, seguido por uma diminuição leve para 0,3% de extrato no iogurte mas que, estatisticamente são considerados iguais ao nível de concentração de 0,1%. Além disso, os resultados médios entre os diferentes dias de armazenamento são iguais estatisticamente entre T0 e T2 e entre T1 e T2. Se fosse desconsiderado o resultado do controle do iogurte para o tempo de armazenagem T1, Os valores médios entre T0 e T2 seriam diferentes estatisticamente.

Globalmente, verificou-se que a presença de extrato de tramazeira no iogurte influenciou os resultados considerando a sua discrepância em relação aos ensaios de controlo. No entanto, parte dos resultados analíticos mostraram tendência decrescente dos

resultados dos ensaios de controlo para os ensaios com presença de extrato de tramazeira no iogurte, o que não era esperado. Novos ensaios serão efetuados de forma a confirmar todos estes resultados.

Na totalidade, verificou-se que o fruto de tramazeria 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 de prateleira em produtos lácteos suplementados com extratos de plantas. Por exemplo, dos iogurtes com extratos hidroetanólicos de *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus* (O'Sullivan et al., 2016) ou com extrato de água de *Azadirachta indica* (Shori et al., 2013). A comparação com o sorbato de potássio é relevante pois, embora na Comunidade Europeia a utilização em alimentos seja legal, nos Estados Unidos da América a utilização deste produto é proibida (Mamur et al., 2010). Alguns estudos descrevem o sorbato como apresentando efeitos genotóxicos e/ou mutagénicos fracos (Hasegawa et al., 1984, Mpountoukas et al., 2008), enquanto outros referem que estes efeitos não são relevante (Sasaki et al., 2002; Ferrand et al., 2000). Neste contexto, 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 e 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 já que estes provocam danos hepáticos e carcinogéneos (Meenakshi et al., 2009).

3.5.3. Análises microbiológicas

Na Tabela 8 estão sumariados os valores obtidos nas análises microbiológicas efetuadas às amostras de iogurte nos três tempos em estudo (T0, T1 e T2).

Tabela 8: Bolores e leveduras, Bactérias lácticas, *Escherichia coli*/Coliformes totais e Estafilococos coagulase-positiva em durante armazenamento a 4°C por 14 dias.

Tempo (dias)	Amostras	Coliformes totais UFC/mL	<i>E. coli</i> UFC/mL	<i>S. aureus</i> coagulase positiva UFC/mL)	Bactérias Lácticas log UFC/mL	Mesófilos totais log UFC/mL	Bolores e Leveduras log UFC/mL
0	C	<1	<1	ausente	7,63±0,04	8,50±0,50	1
	0,10%	<1	<1	ausente	7,60±0,01	7,90±0,10	1
	0,30%	<1	<1	ausente	7,63±0,01	8,10±0,05	1
7	C	<1	<1	ausente	9,20±0,20	8,94±0,02	1
	0,10%	<1	<1	ausente	7,44±0,01	8,29±0,03	1
	0,30%	<1	<1	ausente	8,42±0,02	8,62±0,01	1
14	C	<1	<1	ausente	5,88±0,03	7,23±0,16	1
	0,10%	<1	<1	ausente	6,68±0,03	6,78±0,43	1
	0,30%	<1	<1	ausente	5,94±0,03	7,23±0,34	1

Em todas as amostras de iogurte nos diferentes tempos analisados, constatou-se que *Escherichia coli* /coliformes totais e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva estavam ausentes. Estes resultados demonstraram que as amostras em questão se encontravam em conformidade com os padrões microbiológicos europeus estipulados para a qualidade microbiológica do iogurte. As leveduras estavam ausentes em todas as amostras analisadas indicando que as práticas sanitárias durante o fabrico e embalagem foram adequadas. De acordo com Franco & Landgraf (1996), a contagem de bolores e leveduras é um indicador geral de contaminação dos alimentos, ou seja, são grupos de microrganismos que, quando presentes em números elevados nos alimentos e se as condições para se multiplicar forem adequadas, poderão causar a deterioração e/ou redução da vida de prateleira. A análise de bactérias lácticas indica que no tempo 0 as contagens oscilaram entre 7,6 e 7,63 log UFC/mL. Ao 7º dia de análise o valor mais elevado foi 9,2 log UFC/mL na amostra controlo e o mais reduzido foi 6,48 log UFC/mL na amostra com 0,1% de extrato. Após 14 dias de armazenamento verificou-se um ligeiro decréscimo nos valores obtidos em todas as amostras. Os resultados sugerem que o extrato de tramazeira não influenciou acentuadamente o crescimento de bactérias lácticas. Os mesófilos totais desempenham um papel crucial na avaliação da integridade sanitária dos produtos alimentícios. Baixos níveis desses indicadores denotam uma elevada qualidade higiénica do produto. No entanto, é importante salientar que nos produtos fermentados os mesofilos podem corresponder a bactérias lácticas. Deste modo não são

bons indicadores da qualidade geral do iogurte, práticas de fabrico, matérias-primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira.

Apesar da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos ser um parâmetro microbiológico não diretamente relacionado com a saúde do consumidor, reflete a qualidade da matéria-prima utilizada e as práticas adotadas durante toda a cadeia de produção, nomeadamente as condições de processamento, manuseamento e armazenamento (Mello et al., 2010; Careli et al., 2003). No entanto, não permite uma avaliação segura dos alimentos fermentados, e prontos a comer (Health Protection Agency, 2009), pois geralmente verifica-se a sua presença em níveis elevados em alimentos crus (ex. saladas) e em alimentos cujas fases de processamento estão sujeitos a fatores ambientais, indicando apenas problemas de qualidade da matéria-prima e possíveis falhas no controlo da temperatura (Rodrigues et al., 2003)

A Tabela 9 apresenta os dados da ANOVA obtidos para as análises microbiológicas relacionadas com a avaliação do crescimento de bactérias lácticas e mesófilos totais, considerando os dois fatores de variação acima referidos.

Tabela 9: Resultados da ANOVA (valores de p) para as análises microbiológicas: bactérias lácticas e mesófilos totais.

Variáveis	Modelo		Termo de interação		Teste SW	Teste Levene
	R ²	RSE	p-value	p-value	p-value	p-value
Bactérias lácticas	0,998	0,070	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,029
Mesófilos totais	0,916	0,256	< 0,001	0,706	0,001	0,076

R² - Coeficiente de determinação; RSE - Erro padrão residual; Teste SW – Teste Shapiro-Wilk.

Os modelos obtidos são significativos, com coeficientes de determinação geralmente superiores a 0,91 (erros inferiores a 0,26), indicando que os modelos podem explicar pelo menos 91% da variabilidade original dos dados experimentais, considerado ajustes aceitáveis. No modelo de ANOVA para as bactérias lácticas, o termo de interação entre os dois fatores foi significativo (valor de p < 0,001) verificando-se que os resultados não cumprem com os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Deste modo, aplicou-se a PERMANOVA que confirmou a significância dos termos, incluindo

o termo da interação (valores de $p < 0,001$). Para avaliar a variação dos resultados entre os ensaios, na Figura 28 apresenta-se a representação gráfica dos efeitos do fator 1 (controle e 2 níveis de concentração de extrato no iogurte) e do fator 2 (tempo de ensaio) com interação no crescimento das bactérias lácticas.

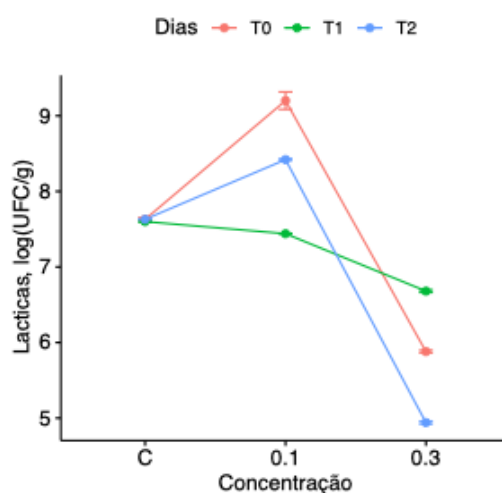


Figura 28: Efeitos dos fatores concentração de extrato no iogurte e tempo de ensaio no crescimento das bactérias lácticas.

A Figura 29 indica que nos três tempos de ensaio não se observou variação significativas nos ensaios de controle, ao contrário do que ocorreu nos ensaios com 0,1 e 0,3 % de extrato no iogurte. Em geral, os iogurtes com 0,1% de extrato têm um aumento de crescimento de bactérias lácticas em relação aos resultados de controle, exceto no ensaio no tempo T1. Este resultado pode ser atribuído a alguma falta de homogeneidade do extrato aplicado pois não era o esperado. Nos iogurtes com 0,3% de extrato constatou-se um crescimento de bactérias lácticas muito inferior aos dos ensaios de controle, que comparativamente aos de 0,1% de extrato, se pode inferir que aquele nível de extrato tem baixo efeito inibitório no crescimento destas bactérias. Uma ligeira redução na contagem de bactérias lácticas durante o tempo de armazenamento foi observada por Silva & Rodrigues (2006). Rodrigues et al. (2010), relata que as bactérias lácteas tendem a diminuir com o tempo, e ao analisarem amostras de iogurtes ao final da data de validade encontrou 7 (19,5%) amostras de iogurtes fora do padrão. Sales et al. (2007) salientam a importância da temperatura de armazenamento ou acondicionamento do iogurte com

implicações nas mudanças das condições microbiológicas do produto, que ocorrem tanto nas indústrias quanto nos estabelecimentos comerciais

No estudo da avaliação dos mesófilos, o modelo de ANOVA mostrou que o termo de interação entre os dois fatores não foi significativo (valor de $p = 0,706$) e verificou-se que os dados não cumprem com o pressuposto de normalidade (teste Shapiro-Wilk com valor de $p = 0,001$). Neste contexto, aplicou-se a PERMANOVA que confirmou a significância dos termos dos factores (valores de $p < 0,002$) e da interação (valor de $p = 0,698$). Na Figura 30 pode observar-se a representação dos efeitos do fator 1 (controlo e 2 níveis de concentração de extrato no iogurte) e do fator 2 (tempo de ensaio) sem interação no crescimento dos mesófilos.

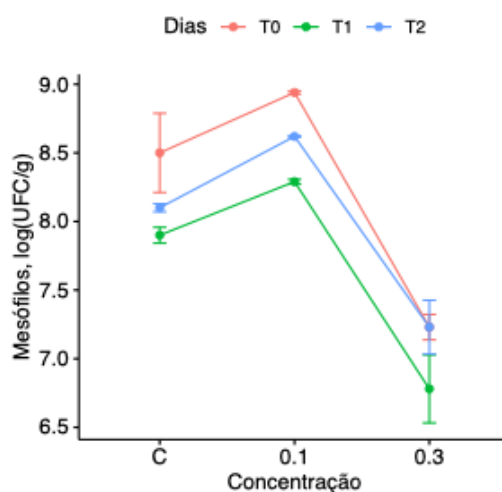


Figura 29: Efeitos dos fatores concentração de extrato no iogurte e tempo de ensaio no crescimento dos mesófilos.

O crescimento dos mesófilos mostrou o mesmo comportamento no controlo e nos dois níveis de extrato adicionados ao iogurte para os três tempos de ensaio, ou seja, valores superiores de crescimento nos ensaios T0 e inferiores, em T1. O facto de o crescimento intermédio ter sido observado nos ensaios T2 não era esperado. Verificou-se também que em relação ao controlo, o crescimento de mesófilos foi superior nos iogurtes com 0,1% de extrato e inferior nos produtos com 0,3% de extrato. Este comportamento foi semelhante ao obtido nos ensaios de crescimento das bactérias lácticas. Isto sugere que a

concentração de 0,1% de extrato não influenciava acentuadamente o crescimento dos mesófilos mas, com os níveis de 0,3%, o efeito é inibitório. Queiroga et al. (2011), não observou presença de bactérias aeróbias mesófilas em amostras de iogurte natural e iogurtes com adição de geleia de abacaxi. Esses resultados não corroboram os obtidos no nosso estudo, pois foi observado crescimento do microrganismo, porém os números estão abaixo dos estipulados pela legislação.

3.5.4. Análise sensorial

A análise sensorial dos iogurtes foi efetuada para avaliar a sua aceitabilidade por parte dos consumidores. 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.

Analisaram-se as amostras de iogurte contendo sorbato de potássio (iogurte convencional) e aquelas enriquecidas com 0,1% de extrato de Tramazeira. Esse percentual foi selecionado com base nos resultados obtidos, os quais indicaram ser a concentração mais eficaz para aplicação. Dentre os participantes abrangidos por esta pesquisa, 53,57% constituíam o gênero feminino, enquanto 46,43% eram do sexo masculino (Figura 30). Esses participantes caracterizavam-se predominantemente por indivíduos consumidores situados na faixa etária entre 19 e 23 anos, apresentando distintos níveis educacionais, sendo 26,79% com ensino superior incompleto, 44,64% com ensino superior completo e 28,57% com pós-graduação (Figura 31).

3. Gênero

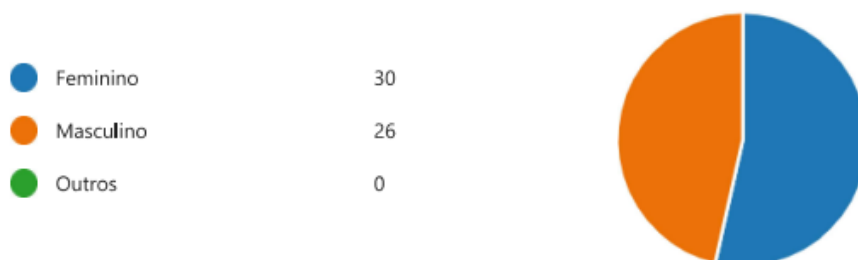


Figura 30: Gráfico circular de gênero dos participantes.

4. Escolaridade

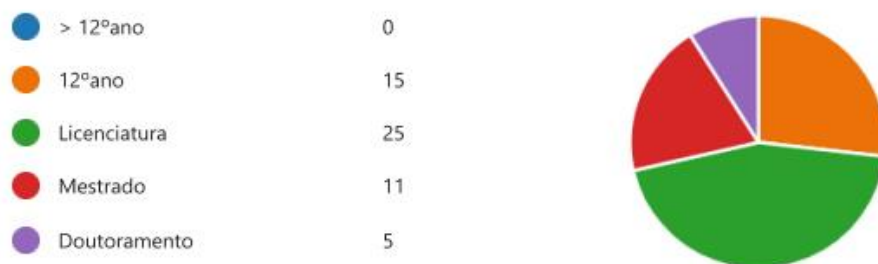


Figura 31: Gráfico circular do nível de escolaridade.

Os resultados da avaliação sensorial evidenciaram que tanto o iogurte convencional, contendo sorbato de potássio, quanto o iogurte enriquecido com extrato de tramazeira, demonstraram uma frequência satisfatória de médias, atingindo 3,7 na escala hedônica que varia de 1 a 5. Esses resultados indicaram uma aceitação favorável por parte dos consumidores em relação ao iogurte enriquecido com o mencionado extrato. No contexto global da avaliação, os iogurtes nos quais foi introduzido 0,1% de extrato do fruto demonstraram médias superiores em relação à aparência, aroma e sabor geral quando comparados aos iogurtes produzidos com sorbato de potássio. Esses valores aproximaram-se da classificação máxima de 5, indicativa de uma qualidade considerada "agradável", conforme evidenciado nas Figuras 32, 33 e 34.

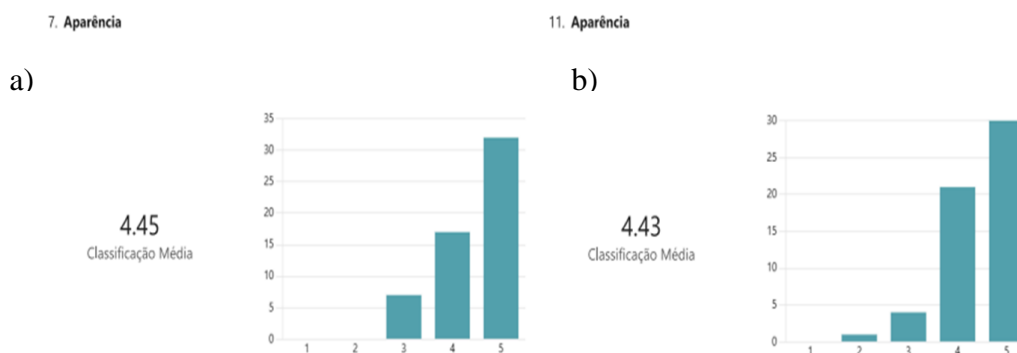
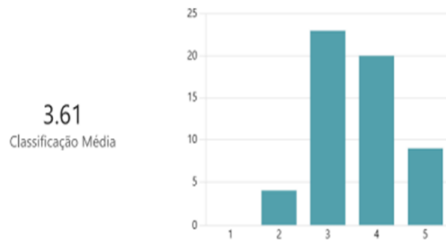


Figura 32: Gráfico de barras do parâmetro aparência do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.

8. Aroma



12. Aroma

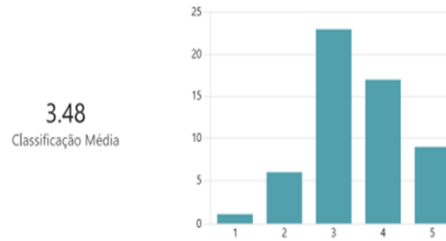
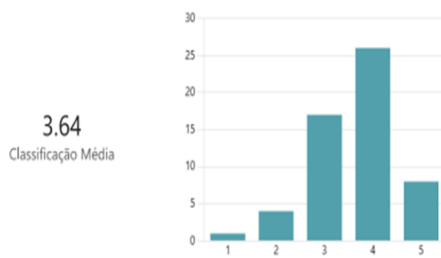


Figura 33:Gráfico de barras do parâmetro aroma do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.

9. Sabor



13. Sabor

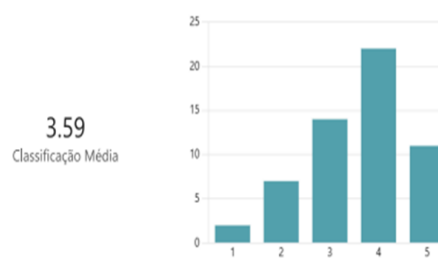
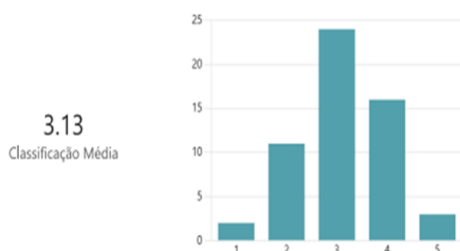


Figura 34:Gráfico de barras do parâmetro sabor do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.

Por outro lado, no que diz respeito à consistência, observou-se que os iogurtes que continham sorbato de potássio receberam classificações superiores, conforme ilustrado na Figura 35.

10. Consistência



14. Consistência

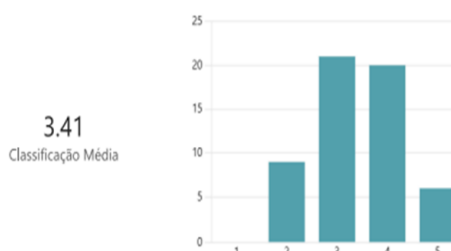


Figura 35: Gráfico de barras do parâmetro consistência do iogurte: a) Iogurte com adição de 0,1% extrato Tramazeira; b) Iogurte com adição de sorbato de potássio.

No que se refere à preferência, constatou-se que as amostras com a adição de extrato obtiveram 53,57% da preferência dos avaliadores, enquanto 46,43% expressaram preferência pela amostra contendo sorbato de potássio (conforme apresentado na Figura 36).

15. Qual a amostra de iogurte que preferiu?



Figura 36: Gráfico circular em relação a aceitabilidade de compra, sendo amostra 123 adicionado de extrato e a amostra 456 acrescentada de sorbato de potássio.

A maioria dos avaliadores (55,36%), indicou que compraria ambos os produtos. Por outro lado, 14,28% afirmaram que não adquiririam, e 30,36% não puderam determinar uma preferência clara, indicando "Talvez compraria" (Figura 37). Entre os fatores mencionados pelos não compradores, um aspecto apontado foi o sabor excessivamente ácido, considerando que o iogurte elaborado não recebeu adição de açúcar.

16. **Compraria este produto?**



Figura 37: Gráfico circular em relação ao poder de compra, sendo amostra 123 adicionado de extrato e a amostra 456 acrescentada de sorbato de potássio.

Pode-se inferir que não foram identificadas diferenças acentuadas entre as amostras; contudo, a amostra contendo 0,1% de extrato de tramazeira foi a preferida pelos consumidores, demonstrando uma aceitação positiva durante a avaliação sensorial.

O estudo mostrou que os provadores, com idades entre 19 e 23 anos, preferiram o iogurte com extrato de tramazeira. No entanto, a faixa etária dos participantes pode ter influenciado os resultados, visto que o consumo de iogurte é mais expressivo entre pessoas de 25 a 34 anos. Essa diferença etária sugere a necessidade de investigações adicionais para verificar se os resultados se mantêm em amostras que representem melhor o grupo etário predominante de consumidores de iogurte. É essencial considerar essa representatividade ao planejar futuros estudos para obter dados mais precisos e úteis para estratégias de mercado na indústria de laticínios.

4. CONCLUSÃO

O fruto de tramazeira 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 uma alternativa natural para substituir os conservantes químicos utilizados atualmente na maioria dos alimentos comercializados em todo mundo. A incorporação do extrato do fruto em alimentos pode ser uma destas alternativas.

O desenho experimental efetuado para a otimização da extração hidro-etanólica dos compostos fenólicos totais do fruto que foi centrado em dois fatores (pH e % etanol), indicou o ótimo para valores de pH de 4,9 e percentagem de etanol de 40. De facto, nestas condições, obtiveram-se os valores mais elevados para TPC e para a actividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH, bem como, para as concentrações de glucose, frutose e sorbitol.

Nos iogurtes constatou-se que a incorporação de extratos do fruto, mesmo em pequenas quantidades, aumentou o teor de fenóis totais e melhorou a atividade antioxidante comparativamente ao iogurte convencional preparado com sorbato de potássio. A composição físico-química dos iogurtes não apresentou diferenças significativas nos iogurtes com incorporação de extrato de Tramazeira e no iogurte convencional preparado com sorbato de potássio. Os valores obtidos para o e pH e a_w indicaram que a incorporação do extrato no iogurte com polpa de morango não interferiu nos parâmetros físico-químicos durante o período de ensaio (14 dias). Além disso, os resultados das análises microbiológicas indicaram que todas as amostras estavam em conformidade com os padrões microbiológicos europeus, garantindo a segurança microbiológica dos produtos. Isso é crucial para a aceitação e confiança dos consumidores nos produtos alimentares que consomem. A presença de extrato de tramazeira nos iogurtes não inibiu o crescimento das bactérias lácticas, sugerindo o potencial probiótico do produto.

No que se refere aos iogurtes adicionados com extrato de tramazeira, os resultados da análise sensorial indicaram uma aceitação favorável por parte dos consumidores, com médias de avaliação de 3,7 na escala hedônica de 1 a 5. Esses resultados sugerem que a adição de 0,1% de extrato de tramazeira melhorou a aparência, aroma e sabor geral destes

produtos lácteos, comparativamente com os iogurtes contendo sorbato de potássio. Adicionalmente, a consistência dos iogurtes com sorbato de potássio foi classificada como superior, indicando que é necessário melhorar esta característica nos iogurtes enriquecidos com extrato de tramazeira.

Em suma, os resultados deste estudo destacam o potencial do extrato de tramazeira como um aditivo natural promissor na indústria alimentar. A elevada atividade antioxidante, juntamente com aceitação sensorial pelos consumidores e conformidade com os padrões microbiológicos, torna-o uma opção viável para a formulação de produtos alimentares saudáveis e de alta qualidade. Porém, é importante ressaltar a necessidade de efetuar estudos adicionais para explorar melhor o potencial desse extrato e garantir sua segurança e eficácia em diferentes aplicações alimentares.

Apesar de preliminares, os resultados indicam que a adição de extrato de tramazeira foi vantajosa na produção de iogurte, pois além de preservar a sua qualidade, melhora os seus compostos biológicos e propriedades bioativas.

REFERÊNCIAS

- Agrícolas, I. E. (2019). Instituto Nacional de Estatística. IP: Lisbon, Portugal, 168.
- Alvarenga, M. B (1995). Manual de produção de iogurtes.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos—uma breve revisão. *Revista do instituto adolfo lutz*, 66(1), 1-9.
- Anderson, M. J. (2014). Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). *Wiley statsref: statistics reference online*, 1-15.
- AOAC. (2016). Association of official analytical chemistry. *Official methods of Analysis*. (20th ed).
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Ares, G., Varela, F., Machin, L., Antúnez, L., Giménez, A., Curutchet, M. R., & Aschemann-Witzel, J. (2018). Comparative performance of three interpretative front-of-pack nutrition labelling schemes: Insights for policy making. *Food quality and preference*, 68, 215-225.
- Arrúa, A., Curutchet, M. R., Rey, N., Barreto, P., Golovchenko, N., Sellanes, A., & Ares, G. (2017). Impact of front-of-pack nutrition information and label design on children's choice of two snack foods: Comparison of warnings and the traffic-light system. *Appetite*, 116, 139-146.
- Arévalo-Pinedo, R., Dos Santos, P. Z., Rolin, C. R., Borges, T. D., Pizato, S., & Cortez-Vega, W. R. (2022). Produção de iogurte desnatado tipo sundae com geleia de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*). *HOLOS*, 8.
- Balange, A. K., & Benjakul, S. (2009). Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*rastrelliger kanagurta*) surimi. *Lwt-food science and technology*, 42(6), 1059-1064.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Belitz, D., Grosch, W., Schieberle, P., Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Vegetables and vegetable products. *Food chemistry*, 772-805.

- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). 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(3), 1157-1165.
- Bertolino, M., Belviso, S., Dal Bello, B., Ghirardello, D., Giordano, M., Rolle, L., Gerbi, V. & Zeppa, G. (2015). Influence of the addition of different hazelnut skins on the physicochemical, antioxidant, polyphenol and sensory properties of yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1145-1154.
- Buttriss, J. (1997). Nutritional properties of fermented milk products. *International journal of dairy technology*, 50(1), 21-27.
- Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., & Zucca, J. (1995). *Microbiología Alimentaria*. Vol. Acribia. Zaragoza, España, 253-260.
- Brandão, S. C. C. (1995). Tecnologia da produção industrial de iogurte. *Leite & Derivados*, 4(25), 24-38.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: Quo vadis?. *Trends in food science & technology*, 45(2), 284-295.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 377-399.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Careli, R. T., Dias, A. S., Andrade, N. J., & Antunes, M. A. (2003). Qualidade de água e condições higiênicas de manipuladores, equipamentos e utensílios em micro-indústrias de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 58(333), 85-88.
- Castro, L. I. A. D., Vilareal, C. M., Pires, I. S. C., Pires, C. V., Pinto, N. A. V. D., Miranda, L. S., Rosa B. C., & Dias, P. A. (2007). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): digestibilidade in vitro, desenvolvimento e análise sensorial de preparações destinadas a pacientes celíacos. *Alimentos e Nutrição*, 18(4), 413-419.

- Castro, D. S., Nunes, J. S., Melo Silva, L. M., Sousa, F. C., & Santos Moreira, I. (2013). Parâmetros físico-químicos de iogurtes naturais comercializados na cidade de Juazeiro do Norte, CE. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8(3), 8.
- Chandan, R. C., White, C. H., Kilara, A., & Hui, Y. H. (eds.). (2008). *Manufacturing yogurt and fermented milks*. John Wiley & Sons.
- Chandan, R. C., & Kilara, A. (Eds.). (2013). *Manufacturing yogurt and fermented milks* (pp. 294-295). Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.
- Corrieu, G., & Béal, C. (2016). *Yogurt: the product and its manufacture*.
- Correa, T., Fierro, C., Reyes, M., Carpentier, F. R. D., Taillie, L. S., & Corvalan, C. (2019). Responses to the Chilean law of food labeling and advertising: exploring knowledge, perceptions and behaviors of mothers of young children. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 16(1), 1-10.
- Costa, R. M. S. D. (2009). *Avaliação do potencial antioxidante da folha de cydonia oblonga miller*, Tese de Bacharelato, UFP, Brasil.
- Deeth, H. C., & Tamime, A. Y. (1981). Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. *Journal of food protection*, 44(1), 78-86.
- Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., & Le Blay, G. (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 185-190.
- Deon, R. G., Rosa, R. D., Zanardo, V. P. S., Closs, V. E., & Schwanke, C. H. A. (2015). Consumo de alimentos dos grupos que compõem a pirâmide alimentar americana por idosos brasileiros: uma revisão. *Ciência & Saúde*, 8(1), 26-34.
- Dioso, C. M., Vital, P., Arellano, K., Park, H., Todorov, S. D., Ji, Y., & Holzapfel, W. (2020). Do your kids get what you paid for? evaluation of commercially available probiotic products intended for children in the republic of the philippines and the republic of korea. *Foods*, 9(9), 1229.
- Duran, R. M., & Padilla, R. B. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas e Aceites*, 44(2), 101-106.

- Europeia, C. (1994). Direção Geral da Agricultura. LEADER II: Desenvolvimento das zonas rurais desfavorecidas da União Européia.
- Fao. (2017). Organização das nações unidas para agricultura e alimentação. Pecuária primária.
- Tramazeira (1753), sorbus aucuparia, <https://www.florestar.net/tramazeira-sorbus-aucuparia> (consultado em 5 de Fevereiro de 2024).
- Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. L. (1996). Microbiologia Dos Alimentos, p 178. São Paulo, Brazil: Editora Atheneu.
- Ferreira, I. C., & Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. Bioanálise, 32-39.
- Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cassand, P., & de Saint Blanquat, G. (2000). Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food conditions. Amino Acids, 18, 251-263.
- Fonseca, C. M., Boari, C. A., Domingues, P. H. F., Meira, D. P., Fernandes, L. S. F., & Dumont, M. A. (2014). Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz). Semina: Ciências Agrárias, 35(4), 1829-1836.
- Forni, E., Erba, M. L., Maestrelli, A., & Polesello, A. (1992). Sorbitol and free sugar contents in plums. Food Chemistry, 44(4), 269-275.
- Galo, G. T., Lima, A. C. D. S., Machado, K. M., Vieira, L. B., Martins, V. C., Ferreira, N. L., & Lucarini, A. C. (2018). Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium cepa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural. The Journal of Engineering and Exact Sciences, 4(1), 0153-0162.
- Giese, S., Coelho, S. R. M., Téó, C. R. P. A., Nóbrega, L. H. P., & Christ, D. (2010). Caracterização físico-química e sensorial de iogurtes comercializados na região Oeste do Paraná. Varia Scientia Agrárias, 1(1), 121-129.
- Guedes, J., & Dias, J. G. (2016). Avaliação da estabilidade de iogurte concentrado salgado adicionado de especiarias durante o armazenamento.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55(6), 481-504.

- Hasegawa, M. M., Nishi, Y., Ohkawa, Y., & Inui, N. (1984). 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(7), 501-507.
- Hatano, T., Kagawa, T., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36(6), 2090-2097.
- Havenaar, R., & Huis in't veld, J. H. (1992). Probiotics: a general view. *The lactic acid bacteria volume 1: the lactic acid bacteria in health and disease*, Elsevier Appl Sci, 1, 151-170.
- Hekmat, S., & Reid, G. (2006). Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutrition research*, 26(4), 163-166.
- Health Protection Agency. (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market.
- Hukkanen, A. T., Pölönen, S. S., Kärenlampi, S. O., & Kokko, H. I. (2006). Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 112-119.
- Hurtado-fernández, E., Gómez-romero, M., Carrasco-pancorbo, A., & Fernández-gutiérrez, A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(5), 1130-1160.
- Hermanns, G., Funck, G. D., Schmidt, J. T., & dos Santos Richards, N. S. P. (2013). Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 11(2), 191-196.
- Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical nutrition*, 29(6), 701-725.
- Imeh, U., & Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6301-6306.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2019). Consumo humano de leite e produtos lácteos (t) por Tipo de leites e produtos lácteos,

https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contecto=pi&indOcorrCod=0000213&selTab=tab0&xlang=pt (consultado em 5 de Fevereiro de 2024).

- Jankun, A. (1993). Znaczenie apomiksji w ewolucji rodzaju sorbus [rosaceae]. *Fragmenta floristica et geobotanica*, 38(2), 627-686.
- Kanter, R., Vanderlee, L., & Vandevijvere, S. (2018). Front-of-package nutrition labelling policy: global progress and future directions. *Public Health Nutrition*, 21(8), 1399-1408.
- Khandpur, N., Sato, P. D. M., Mais, L. A., Martins, A. P. B., Spinillo, C. G., Garcia, M. T., & Jaime, P. C. (2018). Are front-of-package warning labels more effective at communicating nutrition information than traffic-light labels? A randomized controlled experiment in a Brazilian sample. *Nutrients*, 10(6), 688.
- Lacombe, A., & Wu, V. C. (2017). The potential of berries to serve as selective inhibitors of pathogens and promoters of beneficial microorganisms. *Food quality and safety*, 1(1), 3-12.
- Leonardi, J. G., & Azevedo, B. M. (2018). Métodos de conservação de alimentos. *Revista Saúde em foco*, 10(1), 51-61.
- Liepina, I., Nikolajeva, V., & Jakobsons, I. (2013). Antimicrobial activity of extracts from fruits of aronia melanocarpa and sorbus aucuparia. *Environmental and experimental biology*, 11(4), 195-199.
- Liu, D. (2018). Effect of fuzhuan brick-tea addition on the quality and antioxidant activity of skimmed set-type yoghurt. *International journal of dairy technology*, 71, 22-33.
- Liu, Z., Bhandari, B., & Zhang, M. (2020). Incorporation of probiotics (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) into 3D printed mashed potatoes: Effects of variables on the viability. *Food Research International*, 128, 108795.
- Lourens-hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International dairy journal*, 11(1-2), 1-17.
- Martins, C. (2004). O Perfil do Consumo no Setor de Laticínios e as Estratégias de Marketing para o século XXI. ANIL. Síntese. CM Consulting Office.

- Martins, N., Petropoulos, S., & Ferreira, I. C. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre-and post-harvest conditions: A review. *Food chemistry*, 211, 41-50.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., & Yılmaz, S. (2010). Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?. *Toxicology in vitro*, 24(3), 790-794.
- Marinho, M. V. M., Figueirêdo, R. D., Queiroz, A. J. M., Santiago, V. M. S., & Gomes, J. P. (2012). Análise físico-química e sensorial de iogurte de leite de cabra com polpa de umbu. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 14 (Especial), 497-510.
- Mckinley, M. C. (2005). The nutrition and health benefits of yoghurt. *International journal of dairy technology*, 58(1), 1-12.
- Meenakshi, S., Gnanambigai, D. M., Mozhi, S. T., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2009). Total flavanoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. *Global Journal of Pharmacology*, 3(2), 59-62.
- Mello, A. G. D., Gama, M. D. P., Marin, V. A., & Colares, L. G. T. (2010). Conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas nos restaurantes públicos populares do Estado do Rio de Janeiro.
- Mitchell, A. (1974). *A field guide to the trees of britain and northern europe. A field guide to the trees of britain and northern europe.*
- Mikulic-Petkovsek, M., Krska, B., Kiproviski, B., & Veberic, R. (2017). Bioactive components and antioxidant capacity of fruits from nine *Sorbus* genotypes. *Journal of Food Science*, 82(3), 647-658.
- Molina, C. V., Lima, J. G., Moraes, I. C., & Pinho, S. C. (2019). Physicochemical characterization and sensory evaluation of yogurts incorporated with beta-carotene-loaded solid lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate. *Food science and biotechnology*, 28, 59-66.
- Moraes, F. P. (2006). Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista eletrônica de farmácia*, 3(2).

- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E., & Lialiaris, T. (2008). Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2390-2393.
- Naidu, K. A. (2003). Vitamin c in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition journal*, 2, 1-10.
- Nardini, M., Natella, F., Gentili, V., Di felice, M., & Scaccini, C. (1997). Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study. *Archives of biochemistry and biophysics*, 342(1), 157-160.
- Nakatani, N. (1996). Antioxidants from spices and herbs in Natural antioxidants: Chemistry, Health effects and NS applications. Shahidi, F. Ed.
- Nazhand, A., Souto, E. B., Lucarini, M., Souto, S. B., Durazzo, A., & Santini, A. (2020). Ready to use therapeutic beverages: Focus on functional beverages containing probiotics, prebiotics and synbiotics. *Beverages*, 6(2), 26.
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., Solymos, P., Stevens, H. M. H., Szocs, E., Wagner, H. H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Cáceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B. R., Hannigan, G., Hill, M. O., Lahti, L., McGlenn, D., Ouelette, M. H., Cunha, E. R., Smith, T. W., Stier, A., Braak, C., & Weedon, J. (2022). *Vegan: Community Ecology Package*, R Package Version 2.6-4.
- Oliveira, R. P. D. S. (2017). *Produtos de origem microbiana de interesse farmacêutico, alimentar e ambiental*.
- Oliveira, D., Vidal, L., Ares, G., Walter, E. H., Rosenthal, A., & Deliza, R. (2017). Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 234-241.
- Oliveira, F. M., Lyra, I. N., & Esteves, G. S. G. (2013). Avaliação microbiológica e físico-química de iogurtes de morango industrializados e comercializados no município de Linhares-ES. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 15(2), 147-155.

- Ordóñez Pereda, J. A., Rodríguez, M. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H., & Cortecero, M. D. S. (2005). *Tecnologia de alimentos- Alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2.
- Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Vicoso, G. N., & Nero, L. A. (2010). Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne pathogens and disease*, 7(2), 175-180.
- O'sullivan, A. M., O'grady, M. N., O'callaghan, Y. C., Smyth, T. J., O'brien, N. M., & Kerry, J. P. (2016). Seaweed extracts as potential functional ingredients in yogurt. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 293-299.
- Phipps, J. B., Robertson, K. R., Smith, P. G., & Rohrer, J. R. (1990). A checklist of the subfamily maloideae (rosaceae). *Canadian journal of botany*, 68(10), 2209-2269.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. CRC press.
- Polônio, M. L. T., & Peres, F. (2009). Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cadernos de saúde pública*, 25, 1653-1666.
- Quintino, S. (2012). Avaliação comparativa de iogurte produzido a partir da polpa natural de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) e suco artificial. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14).
- Rodrigues, K. L., Gomes, J. P., Conceição, R. D. C. D. S. D., Brod, C. S., Carvalhal, J. B., & Aleixo, J. A. G. (2003). Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Food Science and Technology*, 23, 447-452.
- Rodrigues, L. A., Ortolani, M. B. T., & Nero, L. A. (2010). Microbiological quality of yoghurt commercialized in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 4(3), 210-213.
- Saad, S. M. I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, 42, 1-16.

- Sánchez-moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Santos, M. S., 2019. Utilização da própolis vermelha como aditivo alimentar para conservação de iogurte. Escola de nutrição. Universidade federal da bahia, 2019. Tese de doutorado.
- Sales, S. S., Costa, F. N., Alves, L. M. C., Sousa, J. G. D., & Machado, P. P. (2007). Avaliação da qualidade microbiológica de iogurtes de produção regional, comercializados no município de São Luís, MA. *Hig. aliment*, 118-122.
- Santos, J., Araujo, L. F., Junior, A. M. O., Nunes, T. P., & Pagani, A. A. C. (2016). Estudo da estabilidade microbiológica do iogurte liofilizado. In XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais. Gramado.
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. & Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 103-119.
- Schmidt, C. A. P., Pereira, C., Anjos, G. D., & Lucas, S. D. M. (2012). Formulação e avaliação sensorial hedônica de iogurte com polpa de acerola. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia*.
- Schrezenmeir, J., & De vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The american journal of clinical nutrition*, 73(2), 361s-364s.
- Sharif, Z. I. M., Mustapha, F. A., Jai, J., & Zaki, N. A. M. (2017). Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 19.
- Shori, A. B., & Baba, A. S. (2013). Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by *Azadirachta indica*-yogurt. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(3), 295-301.
- Silva, G. S., & Rodrigues, M. A. M. (2006). Avaliação da qualidade de iogurte aromatizado. *Hig. aliment*, 82-85.

- Silva, L. C., Machado, T. B., Silveira, M. L. R., da Rosa, C. S., & Bertagnolli, S. M. M. (2012). Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria-RS. *Disciplinarum Scientia| Saúde*, 13(1), 111-120.
- Silva, R. T., Assis, B. B. T., Costa Monção, É., Moura Fernandes, J., Santos Silva, M. E., Souza Grilo, M. M., Coutinho, T. P. A. & Conceição, M. M. (2020). Análise microbiológica e físico-química de iogurte tipo grego adicionado de geleia de pitanga (*eugenia uniflora* l.). *Brazilian Journal of Development*, 6(5), 24660-24677.
- Silva, A. M. D. O. E., Machado, I. D., Santin, J. R., De melo, I. L. P., Pedrosa, G. V., Genovese, M. I., & Mancini-filho, J. (2015). Aqueous extract of *rosmarinus officinalis* l. Inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytotherapy research*, 29(1), 125-133.
- Silva, F., Oliveira, M. E. G., Sousa, H. M. H., Eduardo, C., & Oliveira, V. (2011). Elaboração de iogurte com leite caprino e geleia de frutas tropicais. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 70(4), 489-96.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos (1999). Lamuela-Raventos: Analysis of total phenoles and other oxidation substartes and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152.
- Souza, C. M. D., Soares, D. Â., Oliveira, G. L., Oliveira Lamas, J. J., Alves, L. A. B., Almeida, P. H. C., Arantes R. S., Silva S. C. B., Santos S. F., Silva V. S., Martins E. M. F., & Martins, M. L. (2020). Probióticos e a indústria de alimentos: Uma visão geral. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*, 1(3), 63-85.
- Árvores e arbustos de portugal, *sorbus aucuparia* – tramazeira, cornogodinho, <https://www.arvoresearbustosdeportugal.com/portfolio-item/tramazeira-sorbus-aucuparia/> (consultado em 5 de Fevereiro de 2024)
- Tamkute, L., Gil, B. M., Carballido, J. R., Pukalskiene, M., & Venskutonis, P. R. (2019). Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products. *Food research international*, 120, 38-51.
- Teixeira, E.; Meinert, E.; Barbeta, P.A. (1987). Análise sensorial dos alimentos. Editora da UFSC.

- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. (No Title).
- Termentzi, A., Kefalas, P., & Kokkalou, E. (2006). Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food chemistry*, 98(4), 599-608.
- Thamer, K. G., & Penna, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Food science and technology*, 26, 589-595.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 5987-6000.
- Tulini, F. L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., & De Martinis, E. C. (2016). Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *Journal of Dairy Research*, 83(1), 115-124.
- União europeia, 2008. Regulamento (ce) n.º 1333/2008 do parlamento Europeu e do conselho relativo aos aditivos alimentares. *Jornal oficial da união europeia*. L 354/16, 16 dezembro.
- Vaquero, M. R., Alberto, M. R., & De nadra, M. M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food control*, 18(2), 93-101.
- Vasconcelos, T. B., Cardoso, A. R. N. R., Josino, J. B., Macena, R. H. M., & Bastos, V. P. D. (2014). Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. *Journal of Health Sciences*, 16(3).
- Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., & Srijaranai, S. (2010). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *Lwt-food science and technology*, 43(9), 1325-1330.
- Wang, H., Livingston, K. A., Fox, C. S., Meigs, J. B., & Jacques, P. F. (2013). Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in american men and women. *Nutrition research*, 33(1), 18-26.

- Weerathilake, W. A. D. V., Rasika, D. M. D., Ruwanmali, J. K. U., & Munasinghe, M. A. D. D. (2014). The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *International journal of scientific and research publications*, 4(4), 1-10.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in food science & technology*, 16(9), 423-428.
- Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-garcía, O., Canteras, M., & Teruel, J. A. L. (2004). Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and cancer*, 49(2), 191-199.
- Yazaki, K., Sasaki, K., & Tsurumaru, Y. (2009). Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1739-1745.
- Yildiz, F. (2016). Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. CRC press.
- Yildiz, E., & Ozcan, T. (2019). Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. *International journal of dairy technology*, 72(2), 199-207.
- Yin, Y., Zhang, Y., Li, H., Zhao, Y., Cai, E., Zhu, H., & Liu, J. (2019). Triterpenoids from fruits of *sorbus pohuashanensis* inhibit acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 109, 493-502.