



Universidade Departamento de Química
de Aveiro
2012

**Maria Carlota de
Mendanha Soares
Simões de Carvalho**

**Estudo da evolução de carotenos e de
açúcares em tomate cereja**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2012

**Maria Carlota de
Mendanha Soares
Simões de Carvalho**

Estudo da evolução de carotenos e de açúcares em tomate cereja

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Especialidade Biotecnologia Alimentar (2º Ciclo), realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo sentido de perseverança que me inculcaram e pelo apoio incondicional.

O júri

Prof. Doutor João Manuel Coutinho
Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (presidente do júri)

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo
Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (orientadora)

Prof. Doutora Carla Alexandra Nunes
Professora auxiliar convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro (arguente)

Prof. Doutor Jorge Saraiva
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (coorientador)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por todo o apoio e pela compreensão da minha ausência nalguns momentos da minha vida académica. Agradeço-lhes também por me terem proporcionado esta maravilhosa oportunidade de poder seguir o rumo académico que mais desejava.

Gostaria de agradecer à Doutora Ivonne Delgadillo pela oportunidade de poder trabalhar num tema que tanto prazer me deu.

Não podia deixar de agradecer de uma forma especial a uma pessoa que se tornou fundamental ao meu desempenho. Obrigada Catarina Fernandes pelo auxílio técnico, pelo apoio emocional e pela bonita amizade que criámos.

Agradeço aos colegas e amigos do grupo de Bioquímica e Química dos Alimentos, nomeadamente à Susana Santos, à Dra. Dulce Helena Teixeira e ao Mickael Santos pelo companheirismo e auxílio técnico.

Agradeço ainda à minha mãe, à minha irmã Francisca Carvalho, ao meu namorado Gonçalo Santos, ao meu amigo Diogo Nunes, ao meu amigo Gonçalo Fragoso e à minha amiga Sílvia Sousa pela amizade e pela força transmitida. Foram fundamentais neste meu ano de Dissertação de Mestrado.

Palavras-chave

licopeno, glucose, frutose , Quinta da Azinhaga, frutos ricos em licopeno, tecnologia de alta pressão, bioacessibilidade *in vitro*.

Resumo

O presente trabalho consiste num estudo do conteúdo em carotenóides e açúcares em tomate com elevado teor de licopeno. O tomate em estudo é produzido na Quinta da Azinhaga (Aveiro), a partir de sementes de origem israelita, desenvolvidas por cruzamento de culturas para obtenção de frutos ricos em licopeno.

É apresentado um estudo de quantificação de licopeno e dos açúcares (glucose e frutose) em cinco momentos diferentes do período de maturação do fruto. Para o tomate maduro apresenta-se ainda o resultado do impacto do processamento pela tecnologia de alta pressão na extração dos carotenos e na sua bioacessibilidade *in vitro*.

Pode confirmar-se que estes cultivares de tomate possuem uma maior diversidade de carotenóides do que o tomate vulgar. As concentrações de açúcares redutores são também ligeiramente superiores, já o teor de água é inferior ao do tomate vulgar.

A tecnologia de alta pressão aumenta efetivamente a extratabilidade de carotenos em tomate enriquecido em licopeno, à exceção de um cultivar de cor laranja.

A bioacessibilidade é outro aspeto importante, pois é o estudo que simula o impacto dos processos que decorrem do trato gastrointestinal, na forma mais ou menos assimilável dos carotenos. Pôde constatar-se que o processamento por alta pressão diminui a bioacessibilidade destes compostos.

Keywords

lycopene, glucose, fructose , Quinta de Azinhaga, high lycopene fruit, high pressure processment, bioaccessibility in vitro.

Abstract

The present work reports the results from a study about carotenes and reducing sugar content in tomato cultivars with high lycopene content. The crop is sown in Quinta da Azinhaga (Aveiro), from Israeli seeds, obtained by crossing cultures to develop high lycopene cultivars.

The quantification of lycopene and reducing sugars (glucose and fructose) is done during five different moments of fruit maturation. The ripen tomato was submitted to a treatment at 500MPa during 5 minutes and the extractability of carotenes and their bioavailability in vitro was then determined.

It was confirmed that the studied tomato cultivars have higher carotene and sugar levels than the ordinary ones. On the other hand, the water content is lower than in the ordinary cultivars.

The high pressure processing increased effectively the extractability of carotenes in the high lycopene tomatoes. However, the same did not happened with one of the orange cultivars.

Another important feature is the bioavailability in vitro, because it simulates the conditions of gastric and intestinal human digestive tract. Thus, it simulates how much carotenes reach the assimilable form during our digestion. It was found that the high pressure processing decreases these compounds bioavailability.

Índice

1. Introdução.....	3
1.1. Tomate.....	3
1.2. Composição química do tomate.....	4
1.2.1 Carotenos – os antioxidantes do tomate.....	6
1.2.2 Características químicas dos principais carotenos do tomate.....	9
1.2.3 Licopeno.....	11
1.2.4 β -caroteno.....	12
1.3. Ciclo metabólico dos carotenóides no tomate.....	12
1.4 Açúcares presentes no tomate.....	15
1.4.1 Características químicas dos principais açúcares do tomate.....	15
1.4.2 Ciclo metabólico dos açúcares no tomate.....	16
1.5 Alta pressão no processamento de alimentos.....	18
1.6 Biodisponibilidade.....	20
1.7. Técnicas de análise com recurso à radiação eletromagnética.....	22
1.7.1 Espectrofotometria UV-Vis.....	22
1.7.2 Lei de Lambert-Beer.....	24
1.7.3 Equipamento.....	25
1.7.4 Espectrofotometria aplicada aos carotenóides e clorofilas.....	27
1.8 Espectroscopia Infravermelho Médio.....	29
1.8.1 Equipamento.....	30
1.8.2 Interpretação dos espectros de IV.....	31
1.8.3 Espectroscopia de IV aplicada à quantificação de açúcares.....	32
2. Material e métodos.....	33
2.1. Recolha da amostragem.....	33
2.2. Análise em componentes principais dos espectros UV/Vis.....	34
2.2.1 Procedimento experimental.....	34
2.3. Quantificação de carotenos (licopeno e β -caroteno).....	34
2.3.1. Curva de calibração de licopeno e de β -caroteno.....	34
2.3.2 Extração e quantificação de licopeno e de β -caroteno no tomate.....	35
2.4 Análise da bioacessibilidade.....	36

2.4.1 Bioacessibilidade <i>in vitro</i> - Simulação do impacto dos acontecimentos digestivos no licopeno e no β -caroteno do tomate	36
2.4.2 Quantificação de carotenos bioacessíveis	37
2.5. Atividade antioxidante pelo radical livre DPPH [*]	38
2.5.1 Curva de calibração do radical livre DPPH	38
2.5.2 Atividade antioxidante do tomate pela captura do radical livre DPPH.....	38
2.6. Determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico.....	39
2.6.1 Curva de calibração dos açúcares.....	39
2.6.2 Quantificação dos açúcares totais do tomate.....	39
2.7. Determinação de açúcares redutores pelo método DNS	40
2.7.1 Curva de calibração dos açúcares redutores do tomate.....	40
2.7.2 Quantificação dos açúcares redutores	41
2.8. Quantificação de glucose e frutose no tomate por IV	41
2.8.1 Modelo de previsão dos teores de glucose e de frutose	42
2.8.2 Quantificação de glucose e de frutose no tomate por espectroscopia de infravermelho	42
2.9. Determinação do extrato seco	43
2.9.1 Procedimento experimental.....	43
3. Resultados e discussão	45
3.1. Otimização da extração e quantificação dos carotenos	45
3.2. Otimização da quantificação dos carotenos na bioacessibilidade	45
3.3. Análise qualitativa dos espectros UV/Vis	46
3.3.1 Cultivar Adina	48
3.3.2 Cultivar Adara	51
3.3.3 Cultivares Amonet, Shir, Zebra e Zmira	52
3.3.4 Cultivar vulgar.....	54
3.4. Quantificação de carotenos	55
3.4.1 Quantificação do licopeno após processamento por AP	58
3.5. Análise da bioacessibilidade	61
3.6 Atividade antioxidante pelo radical livre DPPH	62
3.7. Determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico.....	65
3.8 Quantificação de glucose e frutose no tomate.....	65

3.9. Determinação do extrato seco.....	70
4. Conclusões.....	73
4.1. Trabalho futuro	75
5. Referências Bibliográficas.....	77
Anexos.....	I
Anexo I - Algumas características gerais dos carotenóides	II
Anexo II – Quinta da Azinhaga	III
Anexo III – Resultados	IV

Índice de figuras

Figura 1 – Representação das possíveis geometrias do tomate: A) cultivar precoce com frutos achatados, canelados; B) cultivar tardia com frutos grandes; C) cultivar anglo-holandesa; D) cultivar com frutos oblongos e E) vários cultivar de tomate cereja (adaptado de Naika <i>et al.</i> (2006)).	3
Figura 2 - Mecanismos propostos para o papel do licopeno na prevenção de doenças crônicas. (adaptado de (Agarwal e Rao, 2000).	8
Figura 3 - Estruturas químicas dos principais carotenóides incluídos na dieta humana (adaptado de Rao e Rao (2007)).	10
Figura 4 – Representação das vias biossintéticas de produção de carotenóides nas plantas. Enzimas: DXS - 1-deoxixilulose 5-fosfato sintetase; DXR – deoxixilulose 5-fosfato reductoisomerase; Ipi – isopentenil difosfato isomerase; Ggps – geranilgeranil difosfato sintetase; Psy – fitoeno sintetase; Pds – fitoeno dessaturase; Zds – ζ-caroteno dessaturase; Lcy-e – licopeno ε-ciclase; Lcy-b – licopeno β-ciclase; Cyc-b – licopeno específico cromoplasto ciclase; OHase-b – β-hidroxilase; OHase-e – ε-hidroxilase. Produtos: DOXP – 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato; MEP – 4,difosfocitidil-2-C-metil-D-erititol 2-fosfato; IPP – isopentenil difosfato; DMADP - dimetilalildifosfato, GGPP – geranilgeranil difosfato (adaptado de Hirschberg, 2001).	14
Figura 5 – Representação das estruturas abertas e cíclicas da glucose e da frutose (adaptado de Nelson e Cox, 2005).	16
Figura 6 – Representação da estrutura química da sacarose (Nelson e Cox, 2005).	16
Figura 7 – Modelo dos quatro principais ciclos metabólicos de açúcar no tomate. Legendas: SuSy – sacarose sintetase; SPS – sacarose fosfatosintetase; ADPG - Adenosina difosfoglucose; B – bis; F – frutose; G- glucose; P – fósforo; Enzimas numeradas: (1) UPD-glucose pirofosfatase, (2) fosfoglucomutase, (3) fosfoglucose isomerase, (4) frutoquinase, (5) ADP-glucose pirofosforilase, (6) amido sintetase, (7) amido fosforilase e amilase, (8) glucoquinase e hexoquinase (adaptado a partir de Nguyen-Quoc e Foyer, 2001).	17
Figura 8 - Esquema simplificado do conceito de biodisponibilidade (adaptado de Fernández-García <i>et al.</i> (2009)).	21
Figura 9 – Espectro de radiação eletromagnética (adaptado de University of Colorado at Boulder, 2002).	23
Figura 10 – Diagrama do sistema operacional do espectrofotômetro ótico de feixe duplo (adaptado de Flanagan <i>et al.</i> , 2007).	26
Figura 11 – Captura de um fotão por uma molécula (adaptado de Burgess, 2007).	27
Figura 12 - Espectros de absorvância no visível do licopeno (---), γ-caroteno (- - - -), β-caroteno (-·-·-·-) e α-caroteno (....) em éter de petróleo (Adaptado de Rodriguez-Amaya, 2010).	29
Figura 13 – Regiões do infravermelho do espectro eletromagnético (University of Colorado at Boulder, 2002).	30

Figura 14 – Diagrama do sistema ótico do interferómetro de Michelson (adaptado de Smith, 2011).	30
Figura 15 - Diagrama das coordenadas fatoriais (PC1 vs PC2) das diferentes cultivares de tomate, no dia 24 (tomate maduro).....	47
Figura 16- Mapa das contribuições fatoriais dos cultivares Adina, Adara, Amonet, Shir, Zebra, Zmira e vulgar, no dia 24 (maduros.).....	47
Figura 17 – Na figura estão representados os cultivares em estudo e uma vulgar, no dia 24. Legenda: a) Adina; b) Adara; c) Amonet; d) Zebra; e) Zmira; f) Shir e g) vulgar.....	48
Figura 18 – Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm do cultivar Adina no primeiro dia () e a respetiva deconvolução ()......	49
Figura 19 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm do cultivar Adina no 24º dia () e a respetiva deconvolução ()......	50
Figura 20 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm do cultivar Adina ao longo da maturação. Pormenor da redução do pico da feofitina e clorofila.	51
Figura 21 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm dos espectros normalizados de todos os cultivares no primeiro dia.	52
Figura 22 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm dos cultivares maduros e normalizados dos cultivares Amonet, Shir, Zebra e Zmira. Abaixo dos espectros das amostras encontram-se os espectros dos padrões licopeno e β -caroteno.	53
Figura 23 - Representação de um corte transversal do tomate Zmira, com destaque para a coloração verde devido à presença de clorofilas.	53
Figura 24- Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm dos cultivares maduros no estado maduro (dia 24).....	54
Figura 25 - Representação gráfica da evolução da concentração de licopeno e “outros carotenos” ao longo dos dias de maturação para os diferentes tipos de tomate: a) tomate Adina; b) tomate Adara; c) tomate Amonet; d) tomate Shir, e) tomate Zebra e f) tomate Zmira. Valores ao dia 24 correspondem à concentração antes e após processamento por AP.	56
Figura 26 – Atividade antioxidante hidrofílica dos diferentes cultivares de tomate em estudo. Resultados expressos em % de DPPH em função da concentração da amostra. AP representa as amostras que foram processadas por alta pressão.....	64
Figura 27 – Curvas de calibração obtidas para a frutose e para a glucose pelo método IV-PLS (temperatura da sala $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, HR $40\% \pm 5$).	66
Figura 28 – Representação gráfica da evolução dos teores de açúcar no tomate em estudo ao longo do tempo (dias).	68
Figura 29 – Representação gráfica da evolução dos teores de glucose e frutose ao longo dos diferentes estados de maturação das cinco cultivares de tomate. Resultados obtidos por análise quimiométrica PLS dos espectros de IV do sumo de tomate.	69

Figura A.I. 1 - Representação das estruturas químicas de todos os isómeros do licopeno (Rao e Rao, 2007).....	II
Figura A.III. 1 - Vetores b obtidos pelo PLS1, com 4 variáveis latentes para a frutose..	VIII
Figura A.III. 2 - Vetores b obtidos pelo PLS1, com 4 variáveis latentes para a glucose..	VIII
Figura A.III. 3 - Registo de temperaturas nos meses de Abril e Maio para os anos de 2011 e 2012.....	IX

Índice de tabelas

Tabela 1 – Valor nutricional de tomate fresco maduro (USDA, 2011).....	5
Tabela 2 - Exemplos de espécies reativas que podem oxidar componentes celulares – radicais livres e moléculas potencialmente formadoras de radicais livres (Krzyzanowska <i>et al.</i> , 2010).....	7
Tabela 3 - Carotenóides e clorofilas presentes em tomate e respectivos comprimentos de onda máximos em éter etílico, éter de petróleo ou acetona 80% (adaptado de Porra <i>et al.</i> , 1989, Rodriguez-Amaya, 200, Ötles e Çagindi, 2008 e Eijkelhoff e Dekker, 1997).	28
Tabela 4 – Concentrações de β -caroteno e licopeno nos cinco tipos de tomate em estudo ao fim de 24 dias de maturação. Variação da extração dos carotenos consoante a metodologia: extração simples (ES) e extração após processamento por alta pressão (500 MPa, 5 minutos) (EAP).....	59
Tabela 5 –Bioacessibilidade do licopeno antes e após processamento por AP (500 MPa, 5 minutos) nos seis tipos de tomate maduros.	62
Tabela 6 – Teores de água (%) ao longo da maturação das cinco cultivares em estudo e teor de humidade de um cultivar de tomate maduro vulgar.	71
Tabela A.I. 1 - Comparação da atividade antioxidante de carotenóides (adaptado de Shi e Le Maguer, 2000).	II
Tabela A.III. 1 – Quantificação de β -caroteno e licopeno em diferentes estados de maturação do tomate.....	IV
Tabela A.III. 2 – Atividade antioxidante do tomate maduro pelo radical livre DPPH. Percentagem de DPPH em função da concentração de tomate.	V
Tabela A.III. 3 – Quantificação dos açúcares dos cultivares Adara, Amonet e Zebra maduros de uma plantação do ano de 2011. Valores obtidos por duas técnicas espectrofotométricas com recurso a reagentes diferentes: ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fenol-sulfúrico.	VI
Tabela A.III. 4 – Quantificação de açúcares redutores nas amostras de tomate por espectrofotometria UV/Vis e espectroscopia de infravermelho.	VII

Lista de abreviaturas e símbolos

AP – alta pressão

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

DPPH - 2,2'-difenil-1-picril-hidrazilo

EC₅₀ – “Efficient Concentration”

ES – extração simples

EAP – extração após alta pressão

HR – humidade relativa

IV – infravermelho

I – intensidade da radiação

PCA - “principal component analysis”

PLS - “partial least squares regression”

UV/Vis – ultravioleta e visível

Objetivos

O presente trabalho, desenvolvido no âmbito da Dissertação de Mestrado tem como objetivos determinar:

- O teor e perfil em carotenóides de diferentes cultivares de tomate, com vista em acompanhar o seu amadurecimento;
- A biodisponibilidade dos carotenóides, nomeadamente de licopeno e α -caroteno;
- O efeito do processamento do tomate por alta pressão na extração de carotenóides e no seu impacto na biodisponibilidade e
- O teor de açúcares ao longo do amadurecimento dos cultivares.

O objetivo final consiste em desenvolver um estudo analítico em tomate de elevado valor nutricional e verificar o impacto do processamento deste pela tecnologia de alta pressão. O tomate em estudo é produzido na Quinta da Azinhaga (Aveiro) e pretende-se classificá-lo como fruto potencialmente benéfico para a saúde devido ao papel dos carotenóides como compostos bioativos.

1. Introdução

1.1. Tomate

O cultivo e a confecção de tomate remonta a 500 anos a.C., onde os Aztecas e outras civilizações faziam já uso deste fruto nos seus cozinhados (Attokaran, 2011). A origem do tomate é atribuída às regiões costeiras dos Andes, nomeadamente, Colômbia Equador, Peru e norte do Chile (Pizza and Delivery, 2009). Contudo, a sua introdução na Europa não está claramente definida. Segundo alguns autores, terá sido o espanhol Hernán Cortez, em 1521 por ocasião da conquista da cidade azteca Tecochtitlán (agora a cidade do México), que transportara para a Europa o primeiro tomate pequeno e amarelo. No entanto, outros autores acreditam ter sido Cristóvão Colombo a trazer o tomate para a Europa em 1493 (Attokaran, 2011).

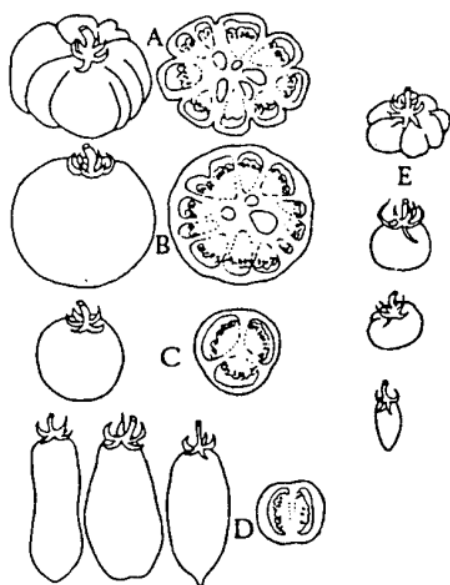


Figura 1 – Representação das possíveis geometrias do tomate: A) cultivar precoce com frutos achatados, canelados; B) cultivar tardia com frutos grandes; C) cultivar anglo-holandesa; D) cultivar com frutos oblongos e E) vários cultivares de tomate cereja (adaptado de Naika *et al.* (2006)).

O tomate, de designação botânica *Lycopersicon esculentum* Mill., da família das *Solanaceae*, espécie *Solanum lycopersicum*, é uma planta perene (vive mais de dois anos) que possui um caule fraco e lenhoso, com um crescimento de 2 até 4 metros de altura. O fruto possui um pH de 3,7 a 4,9 (Swetman *et al.*, 2002) e um ciclo produtivo relativamente curto e de alto rendimento, o que o torna economicamente produtivo (Attokaran, 2011). Existem diversos cultivares de tomateiro, com diferentes características agroclimáticas e com frutos de cores e geometrias diferentes (figura 1). A primeira colheita do fruto pode realizar-se aproximadamente 45 dias após a florescência, ou até 120 depois da sementeira (Naika *et al.*, 2006).

A temperatura ótima de crescimento para a maioria dos cultivares encontra-se entre os 15°-25°C, tendo como limite mínimo de sobrevivência os 10°C e limite máximo 38°C, limites esses que ao serem excedidos danificam os tecidos da planta. Para além disso, necessita de luminosidade solar e queima-se facilmente com a geada. O solo deve ser arejado e com boa capacidade de retenção de água, com pH entre 5,5-6,8. As necessidades

hídricas vão de 20 a 70 mm de água por semana, sendo mais importante a rega em períodos de florescência, fortificação e/ou em períodos secos (Naika *et al.*, 2006). No que diz respeito ao seu armazenamento, o tomate mantém-se relativamente estável durante 4 a 7 dias, a uma temperatura compreendida entre 13° e 15°C e humidade relativa 90 a 95%. Em atmosfera modificada o tomate resiste até 3 meses com CO₂ entre 2,5-9%, O₂ entre 2,5-5,5% e a uma temperatura compreendida entre 12° a 13°C (Swetman *et al.*, 2002).

1.2. Composição química do tomate

Durante o amadurecimento do tomate ocorrem uma série de alterações quantitativas e qualitativas da composição química do tomate. Cerca de 400 compostos aromáticos, ácidos orgânicos, açúcares solúveis, aminoácidos e pigmentos contribuem para a evolução do sabor e aroma do fruto (Hernández Suárez *et al.*, 2008 *apud* Petro-Turza, 1987). A maturação do tomate é caracterizada pelo amolecimento dos tecidos, degradação de clorofilas, aumento da taxa de respiração, produção de etileno, assim como síntese de ácidos, açúcares e licopeno (Hernández Suárez *et al.*, 2008 *apud* Cano *et al.*, 2003).

Na sua composição cerca de 95 % corresponde a água e 4 % a hidratos de carbono, dos quais cerca de 2,62 % correspondem a monossacarídeos (tabela 1). Ao nível de micronutrientes (tabela 1) o tomate é uma boa fonte de potássio, folatos e vitaminas A e C. Comparando com outros vegetais, as concentrações de folatos e potássio são semelhantes, sendo superior a concentração de vitamina C e α -tocoferol, e apenas superior nas cenouras a vitamina A. Para além destes micronutrientes, o tomate é também uma fonte rica de fitoquímicos (tabela 1) (Canene-Adams *et al.*, 2005) com atividade antioxidante: a vitamina C e os polifenóis (flavonóides e ácido hidroxicinâmico) constituem os principais antioxidantes hidrofílicos; a vitamina E e os carotenóides constituem a principal fração de antioxidantes lipofílicos (Takeoka *et al.*, 2001; Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Hsu, 2008). O licopeno e o β -caroteno reúnem maior protagonismo no que diz respeito aos carotenóides, sendo o primeiro o pigmento responsável pela coloração vermelha do tomate e o segundo o pigmento precursor da vitamina A. Segundo a base de dados da USDA (“United States Department of Agriculture”) o conteúdo do tomate em licopeno pode ir de 0,88 a 4,2 mg por 100 g de tomate fresco e o β -caroteno de 0,1 a 0,7 mg por 100 g de tomate fresco (Georgé *et al.*, 2011). No entanto, como é de fácil compreensão, estes valores

variam consoante o cultivar de tomate, o seu estado de maturação, o cultivar e as condições agronómicas (Dumas *et al.*, 2003 *apud* Georgé *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Valor nutricional de tomate fresco maduro (USDA, 2011).

Compostos	Valores por 100 g
Macronutrientes	
Água (g)	94,52
Valor energético (kcal)	18,00
Proteínas (g)	0,88
Lípidos (g)	0,20
Hidratos de Carbono (g)	3,89
Fibra total (g)	1,20
Frutose (g)	1,37
Glucose (g)	1,25
Vitaminas	
Vitamina A (β -caroteno) (IU)	833
Vitamina B1 (tiamina) (mg)	0,037
Vitamina B2 (riboflavina) (mg)	0,019
Vitamina B-6 (mg)	0,08
Vitamina C (ácido ascórbico) (mg)	13,7
Ácido nicotínico (niacina) (mg)	0,594
Vitamina E (α -tocoferol) (mg)	0,540
Carotenóides	
β -caroteno (μ g)	449
α -caroteno (μ g)	101
Licopeno (μ g)	2573
Luteína + Zeaxantina (μ g)	123
Minerais	
Cálcio, Ca (mg)	10
Ferro, Fe (mg)	0,27
Magnésio, Mg (mg)	11
Fósforo, P (mg)	24
Potássio, K (mg)	237
Sódio, Na (mg)	5
Zinco, Zn (mg)	0,17
Cobre, Cu (mg)	0,059
Magnésio, Mn (mg)	0,114

1.2.1 Carotenos – os antioxidantes do tomate

Dos processos decorrentes do metabolismo e da respiração celular resultam metabólitos intermediários designados de radicais livres. Estas moléculas apresentam nas suas órbitas externas um ou mais elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas, uma vez que captam elétrons de outras moléculas. Assim, os radicais livres são considerados agentes oxidantes e apresentam uma função importante na destruição de bactérias e vírus, sendo normalmente neutralizadas por enzimas endógenas antioxidantes, como a Cu/Zn-superóxido dismutase, a Mn-catalase e a glutathione peroxidase (Krzyzanowska *et al.*, 2010).

Existem também fontes externas de radicais livres, como por exemplo os poluentes atmosféricos: ozono atmosférico, fumo dos cigarros, outros poluentes do ar e químicos. Estes fatores contribuem para um aumento da concentração de radicais livre no organismo, a níveis tais que as enzimas endógenas não têm capacidade de os anular. Deste modo, verifica-se um desequilíbrio no organismo entre a excessiva produção de oxigénio e/ou azoto reativos e a limitada atuação das defesas antioxidantes. A este processo dá-se o nome de **stress oxidativo**. Esta perturbação leva à produção de peróxidos e radicais livres que podem afetar gravemente componentes celulares, entre os quais proteínas, lípidos, polissacarídeos e o ADN, originando doenças degenerativas (Krzyzanowska *et al.*, 2010). Os radicais que ocorrem com maior frequência nos sistemas celulares são o superóxido (O_2^-) e o hidroxilo (OH^\cdot). Existem ainda moléculas que podem formar radicais livres através de uma sequência de reações químicas, preferencialmente na presença de metais reduzidos. Nesta categoria de espécies não radicalares (potencialmente formadoras de radicais livres) incluem-se o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Krzyzanowska *et al.*, 2010). Estas espécies reativas de oxigénio encontram-se resumidas na tabela 2. Os antioxidantes são por definição moléculas dotadas da capacidade de anular radicais livres, ou espécies reativas. Deste modo, os antioxidantes representam um grupo de moléculas, ou metabólitos secundários, dotadas da capacidade de capturar radicais livres, eliminando assim o potencial oxidativo destes.

Tabela 2 - Exemplos de espécies reativas que podem oxidar componentes celulares – radicais livres e moléculas potencialmente formadoras de radicais livres (Krzyzanowska *et al.*, 2010).

Radicais livres	
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$
Hidroxil	OH^{\cdot}
Hidroperoxil	HO_2^{\cdot}
Carbonato	$CO_3^{\cdot-}$
Peroxil	RO_2^{\cdot}
Alcoxil	RO^{\cdot}
Radical dióxido de carbono	$CO_2^{\cdot-}$
Não radicalares	
Peroxido de hidrogénio	H_2O_2
Ácido hipobromoso	$HOBr$
Ácido hidrocloroso	$HOCl$
Ozono	O_3
Ácido peroxinitroso	OOH
Peróxidos orgânicos	$ROOH$
Peroxinitrito	$ONOO^-$
Peroxinitrato	O_2NOO^-
Oxigénio singleto	1O_2
Peroxomonocarbonato	$HOOCO_2^-$
Nitrosoperoxicarbonato	$ONOOCO_2^-$

Como já foi referido anteriormente, as enzimas anulam o potencial oxidativo das espécies reativas, representando assim uma importante categoria de antioxidantes. No entanto, existem pelo menos mais três categorias de antioxidantes: a) proteínas, como a albumina, a ceruloplasmina e a ferritina; b) pequenas moléculas, como o ácido ascórbico, a glutatona, o ácido úrico, o tocoferol, os carotenóides e os (poli)fenóis e c) algumas hormonas, como o estrogénio, a angiotensina e a melatonina (Prior *et al.*, 2005). Os avanços alcançados por estudos epidemiológicos têm vindo a revelar que uma dieta rica em antioxidantes reduz a ocorrência de **stress oxidativo**, contribuindo assim para a prevenção de diversas doenças, incluindo arteriosclerose, hipertensão, inflamações, fibrose quística, diabetes, neoplasias, D. de Parkinson e D. de Alzheimer (Krzyzanowska *et al.*, 2010).

Neste sentido, tem-se vindo a verificar uma necessidade acrescida em inculcar, na população em geral, hábitos de alimentação mais saudáveis. Vários estudos epidemiológicos têm suportado, com evidências experimentais, a hipótese de que uma dieta rica em frutos e vegetais reduz o risco de doenças, quer pela sua riqueza em antioxidantes, quer por possuírem outros fitometabolitos com funções preventivas de doenças (Krzyzanowska *et al.*, 2010). A figura 2 apresenta um esquema da atuação do licopeno como um importante antioxidante do tomate na prevenção destas doenças.

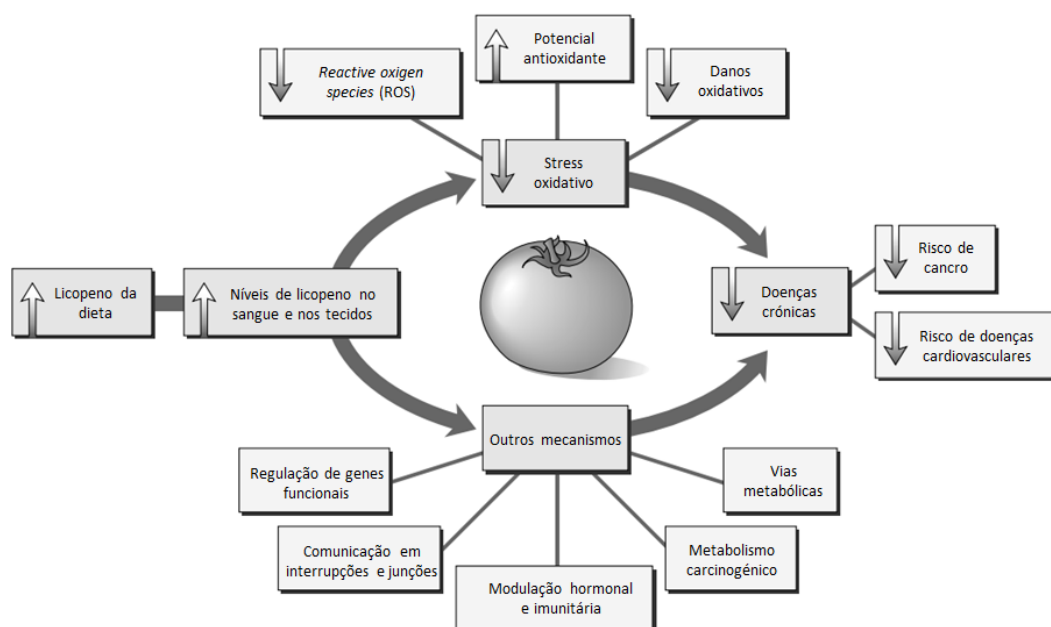


Figura 2 - Mecanismos propostos para o papel do licopeno na prevenção de doenças crónicas. (adaptado de (Agarwal e Rao, 2000).

A dieta Mediterrânea é possivelmente a que fornece maior diversidade e quantidade de carotenóides devido ao elevado consumo de frutos e vegetais (Fernández-García *et al.*, 2011). Nesta dieta é frequente o consumo de tomate, quer na confeção de refeições, quer em cru para saladas. Este fruto é uma das maiores fontes de antioxidantes (em anexo a tabela A.I.1 apresenta atividade antioxidante de vários carotenóides) e a sua ingestão diária contribui com uma quantidade significativa destas biomoléculas. Estudos efetuados relativamente à funcionalidade dos antioxidantes em tomate referem que, quando ingerido em quantidades adequadas, este apresenta-se inversamente relacionadas com o desenvolvimento de doenças de impacto mundial (Rao e Agarwal, 1998; Ilahy *et al.*, 2011). Este efeito protetor tem vindo a ser atribuído fundamentalmente ao seu conteúdo em carotenóides, especialmente o licopeno e o β -caroteno (Clinton, 1998; Sies e Stahl, 1998 *apud* Ilahy *et al.*, 2011).

1.2.2 Características químicas dos principais carotenos do tomate

Os carotenóides são pigmentos que podem ser sintetizados por plantas e por microrganismos, mas não por animais. O seu papel nas plantas consiste na contribuição para as funções fotossintéticas e para a proteção contra danos provocados pela radiação solar. Para além disso, estes fitocompostos conferem aos frutos e vegetais coloração amarela, cor de laranja ou vermelha (Rao e Rao, 2007), que em termos ecológicos possuem um papel importante na polinização e propagação da semente (Dong *et al.*, 2007). A coloração conferida pelos carotenóides torna alguns frutos e vegetais mais atraentes, o que constitui um dos principais atributos de qualidade e aparência que determinam a aceitabilidade dos consumidores. Por este motivo, os carotenóides são vistos pelas indústrias alimentares como um benefício económicos, sendo muito apreciados pelos nutricionistas e investigadores devido ao seu efeito positivo na saúde (Fernández-García *et al.*, 2011).

Foram já identificados na natureza cerca de 700 carotenóides, embora apenas 40 estejam tradicionalmente presentes na alimentação humana. Destes presentes na dieta, apenas 20 foram já identificados nos tecidos e na corrente sanguínea humana. O leque é ainda reduzido para 6 se se considerarem apenas os carotenóides mais frequentes na corrente sanguínea, passando a citar: o licopeno, o α -caroteno, o β -caroteno, a luteína, a criptoxantina e a zeaxantina (Rao e Rao, 2007; Fernández-García *et al.*, 2011).

Estruturalmente os carotenóides pertencem à família dos tetraterpenos, ou seja, são constituídos por quarenta átomos de carbono, formados pela condensação de oito unidades de isoprenos. A sua longa cadeia de ligações duplas conjugadas possui simetria bilateral em torno da ligação dupla central. Este conjunto de ligações duplas conjugadas é responsável pela absorção da luz na região do espectro visível (Krzyzanowska

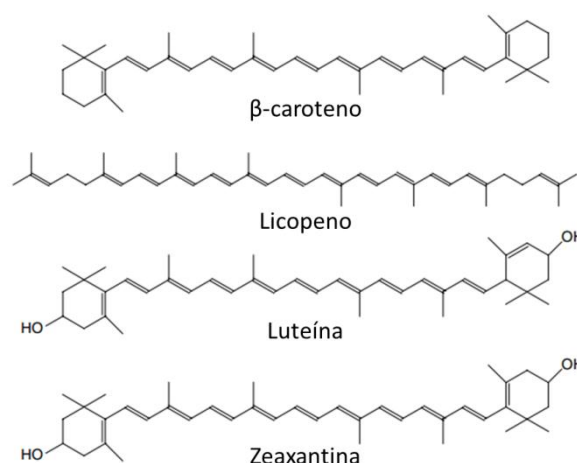


Figura 3 - Estruturas químicas dos principais carotenóides incluídos na dieta humana (adaptado de Rao e Rao (2007)).

et al., 2010). As suas diferentes colorações e as propriedades antioxidantes resultam essencialmente de dois tipos de modificações da estrutura base: ciclização de grupos terminais ou introdução átomos de oxigénio (Rao e Rao, 2007). Assim, os carotenóides podem pertencer a duas classes distintas: carotenos, quando são insaturados e apenas contêm átomos de carbono e hidrogénio (hidrocarbonetos); e xantofilas (oxicarotenóides), quando para além de átomos de carbono e hidrogénio, possuem, pelo menos, um átomo de oxigénio localizado no anel lateral (Shi e Le Maguer, 2000; Krzyzanowska *et al.*, 2010). Na figura 3 encontram-se representados quatro exemplos de carotenóides pertencentes às duas classes.

Devido à presença de ligações duplas os carotenóides podem sofrer isomerização para as conformações *cis-trans*, sendo a forma *trans* a que se apresenta termodinamicamente mais estável e, por isso, a mais comum nos alimentos. No entanto, têm sido divulgados dados que evidenciam a presença de isómeros *cis* em vegetais e também nalguns frutos. A forma *cis* pode surgir ainda como resultado do processamento alimentar (Krzyzanowska *et al.*, 2010).

Os carotenóides podem estar presentes num vasto número de alimentos, mas as maiores fontes são os frutos amarelos e cor de laranja, vegetais verdes e suas folhas. É importante praticar uma dieta rica nestes vegetais, porque os carotenóides estão associados a uma reconhecida panóplia de benefícios na saúde em geral. Podem citar-se algumas funções, como o importante papel na comunicação celular e a proteção contra processos de

fotoxidação induzidos pelo oxigénio reativo (singlete) e eliminação dos radicais peróxido, podendo ainda interagir de forma sinérgica com outros antioxidantes.

Desta forma, estes compostos bioativos conferem um efeito positivo na prevenção de doenças, nomeadamente doenças cardiovasculares, e contribuem para a redução do risco de alguns tipos de neoplasias (do pulmão, do cólon, da mama e da próstata). Estudos recentes têm revelado ainda que estes metabolitos podem atuar sobre outros mecanismos, nomeadamente mediando a comunicação entre junções interrompidas, regulando o crescimento celular, modulando a expressão genética e intervindo na resposta imunitária (Krzyzanowska *et al.*, 2010).

1.2.3 Licopeno

O licopeno é um caroteno de coloração vermelha e fórmula química $C_{40}H_{56}$. É o carotenóide mais abundante no tomate, constituindo aproximadamente 80-90% dos seus pigmentos. Consiste num hidrocarboneto poliénico (poli-insaturado) alifático (de cadeia aberta), composto por 13 cadeias duplas, das quais 11 são conjugadas, dando forma à estrutura linear. Dois grupos centrais metil encontram-se na posição 1,6, enquanto os restantes grupos metil se encontram na posição 1,5, na distância entre eles. As ligações duplas conjugadas conferem cromatogramas de diferentes comprimentos de onda, responsáveis pela sua cor e atividade antioxidante. Na natureza, encontra-se predominantemente na forma *trans*, sendo esta a geometria termodinamicamente mais estável. No entanto, sete das suas ligações podem sofrer isomerização, para a forma mono ou poli-*cis* (isómeros do licopeno na figura A.I.1 em anexo), por influência do calor, da luz, ou por determinadas reações químicas, e por iões metálicos (Cu^{2+} e Fe^{3+}) que catalisam a sua oxidação. Assim, durante o processamento térmico e armazenamento os derivados de tomate passam a possuir o licopeno *trans* entre 35 a 96% do licopeno total. O potencial bioativo do licopeno na forma dos isómeros *cis* é alterado, devido às alterações da forma da estrutura, relativamente à forma *trans*.

O licopeno é hidrofóbico e dissolve-se em solventes orgânicos como clorofórmio, hexano, benzeno, dissulfeto de carbono, éter de petróleo. Dos carotenóides na natureza, o licopeno é um dos antioxidantes mais eficientes na eliminação do oxigénio “singlet”. O seu poder antioxidante é superior, no dobro, ao β -caroteno e 10 vezes superior ao α -tocoferol (Shi e Le Maguer, 2000).

1.2.4 β -caroteno

O β -caroteno possui uma coloração laranja e possui igualmente a fórmula química $C_{40}H_{56}$. É constituído por uma cadeia simétrica de 11 ligações duplas conjugadas com ramificações metil, espaçadas ao longo da cadeia. Os seus grupos terminais possuem o cicloexenil com substituição 1,1,5-trimetil (Siems *et al.*, 2005). O β -caroteno é o carotenóide que possui a maior atividade de provitamina A (McInerney *et al.*, 2007). Teoricamente, a hidrólise do β -caroteno no intestino origina duas moléculas de retinol (vitamina A). A eficiência de provitamina A noutros carotenóides é cerca de metade da eficiência do β -caroteno (Yeung e Laquatra, 2003). Como composto lipofílico que é, possui boa solubilidade em benzeno, clorofórmio, dissulfido de carbono e solubilidade moderada em éter, éter de petróleo e óleos (NCB), 2011).

1.3. Ciclo metabólico dos carotenóides no tomate

Os carotenóides são sintetizados nos plastídios das plantas. Nos cloroplastos eles acumulam-se inicialmente nas membranas fotossintéticas; nos cromoplastos dos frutos maduros os carotenóides podem encontrar-se nas membranas ou em corpos oleosos ou outras estruturas dentro do estroma. Estes pigmentos lipossolúveis são alguns dos compostos químicos que são produzidos pelas, usualmente conhecidas como, vias metabólicas de biossíntese dos isoprenóides (figura 4). A origem da biossíntese dos carotenóides possui assim uma característica em comum com os outros isoprenóides: inicia-se a partir de um metabolito central, o isopentenil pirofosfato (IPP, C_5).

A principal via precursora do IPP é a 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) decorrente nos plastídeos cujos substratos iniciais são o piruvato (C_3) e o gliceraldeído-3-fosfato (GA3P, C_3). A adição sequencial de três moléculas de IPP ao dimetilalil difosfato, catalisado pela geranylgeranyl difosfato sintetase (Ggps) leva à formação de uma molécula constituída por 20 átomos de carbono, designada geranylgeranyl difosfato (GGPP). Por sua vez, a condensação de duas GGPP pela fitoeno sintetase (PSY) leva, à formação de um composto de 40 átomos de carbono fitoeno (incolor), a primeira estrutura básica dos carotenóides (Cazzonelli e Pogson, 2010). O GGPP é também precursor de uma série de outras ramificação da via dos isoprenóides, tais como giberelinas, clorofilas, tocoferol,

filoquinonas e pastoquinonas, representando o maior ponto de ramificação na formação destes diferentes produtos (Cunningham e Gantt, 1998).

Pela catálise da fitoeno dessaturase (PDS) e da ζ -caroteno dessaturase (ZDS), o fitoeno sofre quatro reações de dessaturação para formar um composto vermelho, o licopeno. O passo seguinte consiste na ciclização do licopeno: a β -ciclase (Lcy-b) catalisa a formação de uma molécula bicíclica, β -caroteno, criando dois anéis β nas suas terminações; a ϵ -ciclase (Lcy-e) catalisa a adição do anel épsilon ao licopeno, formando o δ -caroteno.

Podem ainda ocorrer reações de hidroxilação na posição C₃ de cada anel. Assim, a partir do β -caroteno e do α -caroteno, as enzimas β -hidroxilase e α -hidroxilase podem catalisar a produção de xantofilas: a zeoxantina e a luteína, respetivamente (Cunningham e Gantt, 1998). É de destacar que no tomate existem duas licopeno β -ciclases: a LCY-b e a Cyc-b (cromoplasto-específico licopeno ciclase). A Lcy-b está ativa nos tecidos verdes, enquanto a Cyc-b funciona apenas nos cromoplastos (Hirschberg, 2001).

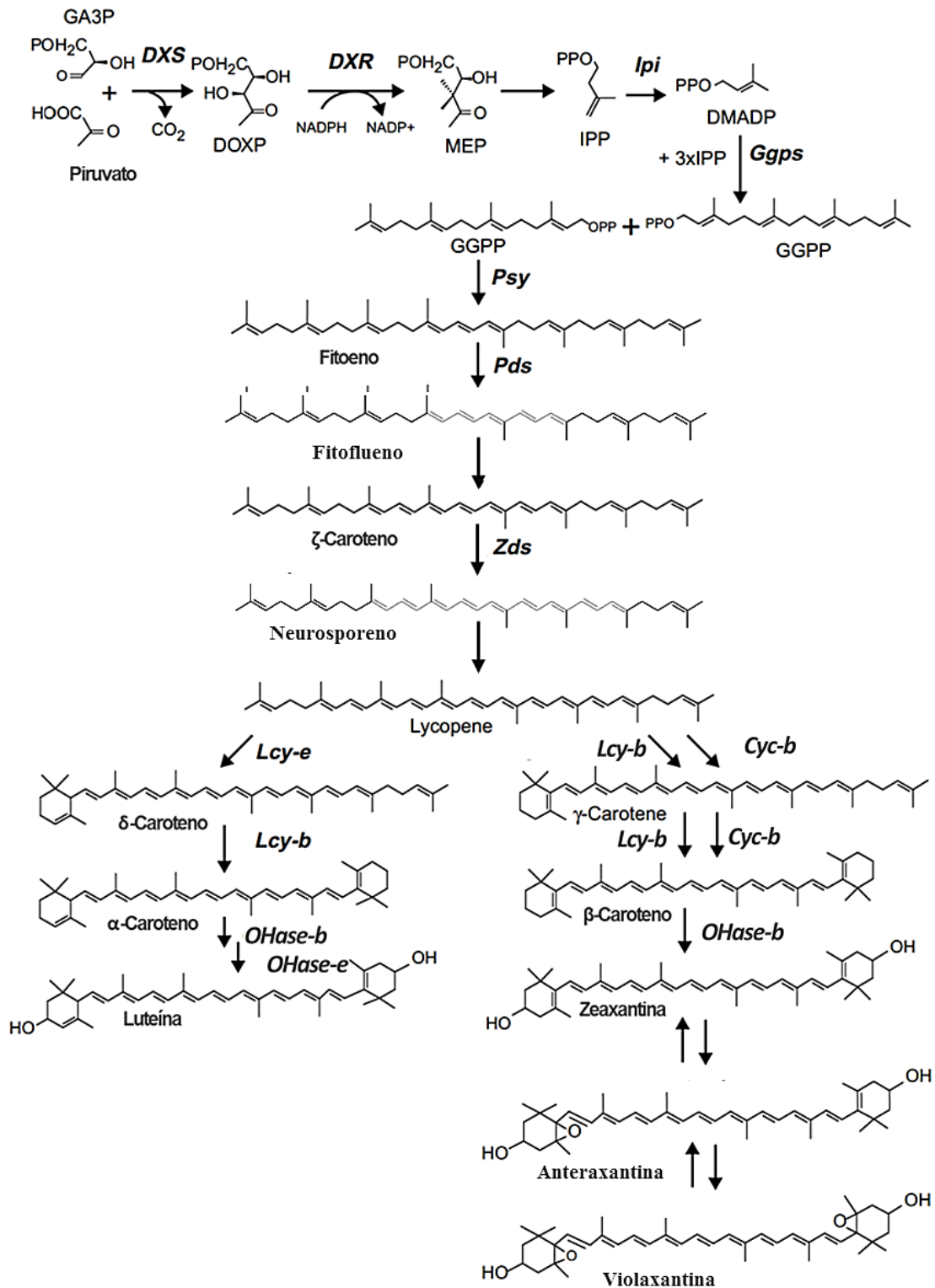


Figura 4 – Representação das vias biossintéticas de produção de carotenóides nas plantas. Enzimas: DXS - 1-deoxixilulose 5-fosfato sintetase; DXR – deoxixilulose 5-fosfato reductoisomerase; Ipi – isopentenil difosfato isomerase; Ggps – geranylgeranyl difosfato sintetase; Psy – fitoeno sintetase; Pds – fitoeno dessaturase; Zds – ζ-caroteno dessaturase; Lcy-e – licopeno ε-ciclase; Lcy-b – licopeno β-ciclase; Cyc-b – licopeno específico cromoplasto ciclase; OHase-b – β-hidroxilase; OHase-e – ε-hidroxilase. Produtos: DOXP – 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato; MEP – 4,difosfocitidil-2-C-metil-D-erititol 2-fosfato; IPP – isopentenil difosfato; DMADP - dimetilalildifosfato, GGPP – geranylgeranyl difosfato (adaptado de Hirschberg, 2001).

1.4 Açúcares presentes no tomate

Os açúcares representam um importante fator na qualidade do tomate. Correspondem a aproximadamente 55 % a 65 % da fração de sólidos solúveis do tomate, contribuindo ainda para o aroma e sabor gerais do fruto. O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) acumula açúcares redutores ao longo do amadurecimento do fruto, com pouca ou nenhuma acumulação de sacarose. No fruto maduro encontra-se tipicamente ligeiramente mais frutose do que glucose (Stommel, 1992), embora o tomate dos dias de hoje possua frutose e glucose na relação de 1:1 (Beckles, 2012).

1.4.1 Características químicas dos principais açúcares do tomate

A glucose e a frutose são hidratos de carbono que não podem ser hidrolisados, pois representam a sua forma mais simples de açúcar. Este tipo de hidratos de carbono adquirem a designação de monossacarídeos.

Os monossacarídeos não possuem coloração, são sólidos cristalinos solúveis em água e insolúveis em solventes não polares. As ligações entre as moléculas destes monossacarídeos são lineares, nas quais todos os átomos de carbono se ligam por ligações simples. Na cadeia aberta (ver figura 5), um dos átomos de carbono possui uma ligação dupla com um átomo de oxigénio, formando um grupo carbonilo (-C=O). Os restantes átomos de carbono possuem um grupo hidroxilo (-OH). Se o grupo carbonilo se localizar no final da cadeia carbonada, o monossacarídeo é uma aldose; se o grupo carbonilo se localizar noutra posição, o monossacarídeo é uma cetose. Deste modo, a frutose é uma aldose e a glucose é uma cetose. Por possuírem seis átomos de carbono na sua composição, a frutose e a glucose podem ser designadas hexoses. Por possuírem um grupo carbonilo sofrem facilmente oxidação na presença de agentes oxidantes, como por exemplo os iões de ferro (Fe^{3+}) e de cobre (Cu^{2+}). Assim, podem ainda tomar a designação de açúcares redutores.

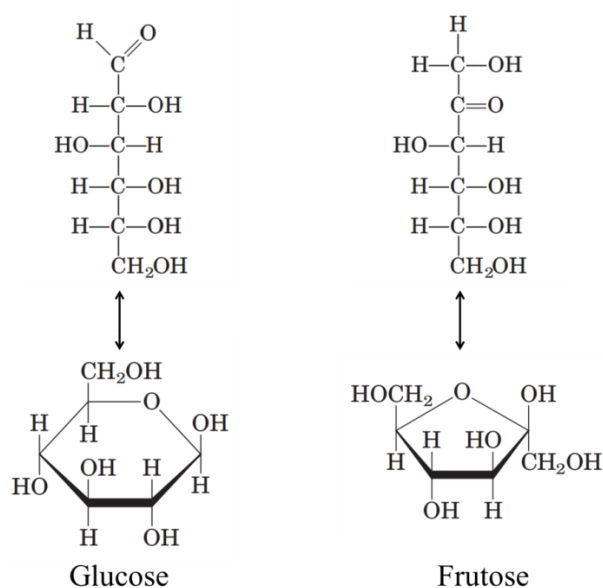


Figura 5 – Representação das estruturas abertas e cíclicas da glucose e da frutose (adaptado de Nelson e Cox, 2005).

A glucose e a frutose juntas formam a sacarose (ver figura 6). Esta reação ocorre entre o grupo hidroxilo da glucose que forma uma ligação glicosídica com o carbono anomérico da frutose (Nelson e Cox, 2005).

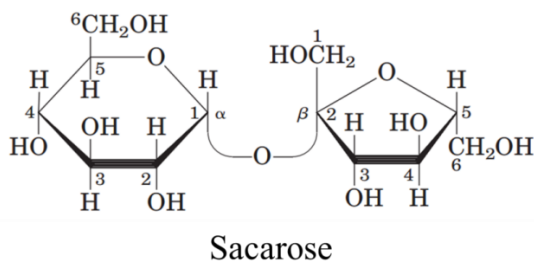


Figura 6 – Representação da estrutura química da sacarose (Nelson e Cox, 2005).

Sendo a glucose e a frutose os principais açúcares do tomate, são também os compostos responsáveis pelo sabor doce do tomate. No que diz respeito ao sabor doce relativo na base da massa, a frutose é mais doce (1,52), seguida da sacarose (1,0) e da glucose (0,76) (Coultrate, 2002).

1.4.2 Ciclo metabólico dos açúcares no tomate

O aumento de hexoses e decréscimo de sacarose nos tecidos celulares está normalmente associada à elevada atividade da enzima invertase (EC 3.2.1.26) presente na planta (Stommel, 1992). Esta enzima participa em, pelo menos, quatro ciclos que

envolvem o transporte de açúcares entre o citosol (região intracelular), o vacúolo e o apoplasto (região extracelular). Estes ciclos metabólicos possuem várias vias que ocorrem em simultâneo e em sentidos opostos, o que leva à degradação de sacarose em hexoses e re-síntese de sacarose. O esquema da figura 7 representa cada uma das etapas deste fenómeno (Nguyen-Quoc e Foyer, 2001).

As reações envolvidas no esquema da figura 7 envolvem os seguintes fenómenos: (a) a contínua e rápida degradação da sacarose no citosol pela sacarose sintetase (SuSy, EC 2.4.1.13); (b) a re-síntese de sacarose quer pela SuSy, ou pela sacarose fosfato sintetase (SPS, EC 2.4.1.14); (c) hidrólise da sacarose nos vacúolos ou nos apoplastos pela invertase ácida (EC 3.2.1.26); (d) o subsequente transporte de hexoses para o citosol, onde são uma vez mais convertidas em sacarose, e (e) a rápida síntese e degradação de amido nos amiloplastos. A produção de hexoses é catalisada por duas enzimas, a SuSy e a invertase.

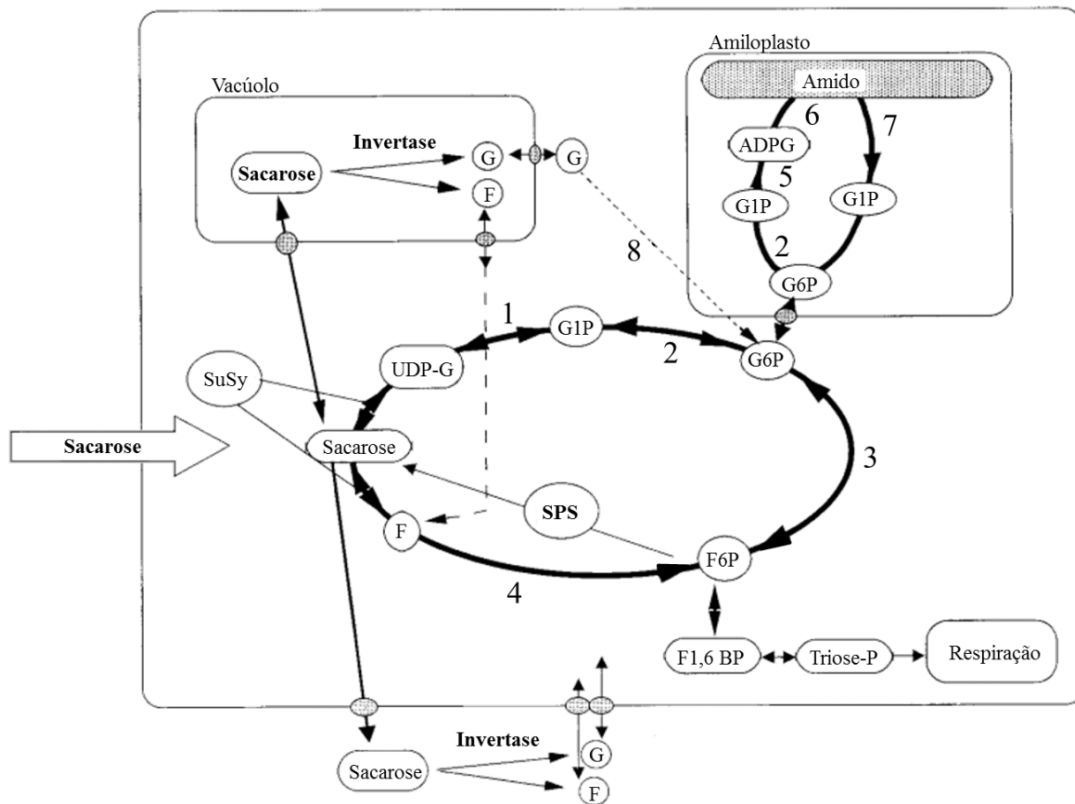


Figura 7 – Modelo dos quatro principais ciclos metabólicos de açúcar no tomate. Legendas: SuSy – sacarose sintetase; SPS – sacarose fosfatossintetase; ADPG - Adenosina difosfoglucose; B – bis; F – frutose; G – glicose; P – fósforo; Enzimas numeradas: (1) UPD-glicose pirofosfatase, (2) fosfoglucomutase, (3) fosfoglucose isomerase, (4) frutoquinase, (5) ADP-glicose pirofosforilase, (6) amido sintetase, (7) amido fosforilase e amilase, (8) glucoquinase e hexoquinase (adaptado a partir de Nguyen-Quoc e Foyer, 2001).

A SuSy é uma glicosil transferase que está presente no citosol e que na presença de UDP (do inglês, “Uridine diphosphate”) converte a sacarose em UDP-glucose e frutose, tornando-se assim crucial na utilização da sacarose para o desenvolvimento/crescimento do tomate. Em contraste, a invertase é uma hidrolase que cliva a sacarose nos seus dois monossacarídeos (glucose e frutose). As invertases extracelulares e vacuolares auxiliam no transporte da sacarose para o apoplasto e vacúolo, até ao transporte de hexoses através do plasmalema (membrana plasmática) e do tonoplasto (membrana lipoproteica que delimita os vacúolos), respetivamente. A maior função da elevada e constante atividade da invertase no tomate vermelho é manter elevadas concentrações de hexoses nas células. Este processo ocorre pela hidrólise da sacarose nos vacúolos e no espaço intercelular, levando a uma maior conversão destes açúcares nestes compartimentos.

O tomate (*L. esculentum*) é caracterizado por aumentar a atividade da invertase e diminuir a atividade da sacarose sintetase ao longo do desenvolvimento do fruto. Para além disso, grande parte das hexoses são armazenadas nos vacúolos, sendo apenas uma pequena parte reintegrada no citosol para sintetizar novamente sacarose. Desta forma, estes ciclos de “trocas” entre sacarose e hexoses determinam o conteúdo e a composição em açúcares do fruto, tornando a frutose e a glucose os principais açúcares presentes no tomate (Nguyen-Quoc e Foyer, 2001).

1.5 Alta pressão no processamento de alimentos

Nos últimos anos o consumidor tem vindo a exigir, cada vez mais, produtos alimentares seguros e minimamente processados. Os processos térmicos convencionais inativam microrganismos e enzimas, permitindo assim um maior prazo de validade dos produtos. No entanto, estes processos afetam de forma negativa as características nutricionais e sensoriais dos alimentos (Hsu, 2008). No sentido de colmatar este facto, surgiram estudos baseados no processamento de alimentos por alta pressão, que logo à partida se revelou como uma alternativa bastante promissora.

A tecnologia de pressão hidrostática é uma técnica alternativa de processamento alimentar que tem vindo a ser desenvolvida desde há cerca de um século (Hite, 1899; FDA, 2000 *apud* Maitland *et al.*, 2011). Esta tecnologia tem sido alvo de maior atenção por parte da comunidade científica nas últimas duas décadas, após o início de estudos no âmbito da aplicação da alta pressão na preservação de alimentos no estado sólido. O processamento

por alta pressão consiste num métodos de preservação de alimentos, onde a pressão é aplicada uniformemente através do alimento, independentemente da forma, sem provocar alterações no seu valor nutricional, no “flavor”, ou na cor. Para além disso, esta tecnologia aumenta o prazo de validade do produto alimentar e confere-lhe uma aparência fresca (Smelt, 1998; Maitland *et al.*, 2011).

Segundo citado por Hogan *et al.* (2005) A tecnologia de alta pressão baseia-se em dois princípios. O primeiro consiste no Princípio de Le Chatelier que é aplicado a qualquer processo/sistema físico e expressa o seguinte: quando um sistema em equilíbrio é perturbado, este responde de forma a tentar minimizar a perturbação. Reportando para a alta pressão, esta beneficia reações que resultam num decréscimo de volume e opõe-se a reações que envolvem um aumento de volume (Pauling, 1964 *apud* Hogan *et al.*, 2005). O segundo princípio consiste no fenómeno Isostático que determina o seguinte: a pressão é transmitida instantânea e uniformemente através de uma amostra sob pressão, quer a amostra esteja em contacto direto com o meio de pressão, ou selada hermeticamente numa embalagem flexível que transmite a pressão. O tempo necessário para o processamento por alta pressão é assim independente do tamanho da amostra (Olsson, 1995 *apud* Hogan *et al.*, 2005).

Os alimentos, quer no estado líquido, quer no estado sólido, podem ser submetidos a pressões compreendidas entre 100 a 800 MPa, a temperaturas que podem ir de 0 a 100 °C e, dependendo da sua consistência, de um modo geral mantêm a sua qualidade (FDA, 2000). A partir dos vários estudos já desenvolvidos nesta matéria, sabe-se hoje que a pressões entre 300 e 600 MPa se consegue inativar a maioria das bactérias na forma vegetativa, mantendo-se inalterados compostos como os que conferem o sabor, as vitaminas e outras moléculas pequenas (Tauscher, 1995; Smelt, 1998). O processo é mais eficiente em alimentos com elevado teor de humidade, especialmente em líquidos. Atualmente, a alta pressão é já aplicado ao nível industrial numa vasta gama de produtos, como por exemplo: molhos de tomate, compotas, preparados de frutas de maçã, sumos, guacamole, carnes e marisco (FDA, 2000; Grove *et al.*, 2006 *apud* Maitland *et al.*, 2011).

A alta pressão interfere apenas com as ligações não covalentes, o que a torna uma boa alternativa ao tratamento pelo calor, no contexto de preservação de alimentos (Cheftel, 1992 *apud* Hsu, 2008). Por esta razão, esta tecnologia constitui para a indústria alimentar uma excelente opção para a produção de alimentos de alta qualidade, uma vez que produz

efeitos mínimos ao nível do sabor, textura, aparência e valor nutricional (Gupta *et al.*, 2011).

A combinação da alta pressão com a temperatura permite obter resultados interessantes. Numa gama de pressão compreendida entre os 400-600 MPa e a temperaturas de refrigeração ou a temperaturas amenas pode obter-se um processo semelhante à Pasteurização, o qual se designa como HPP (do inglês, “High-Pressure Processing”). Pode ainda realizar-se uma esterilização, designada como PATP (do inglês, “Pressure-Assisted Thermal Processing”), recorrendo-se a uma pressão na gama dos 500-700 MPa e temperaturas entre 90-120°C (Rastogi *et al.*, 2007; Balasubramaniam e Farkas, 2008; Gupta *et al.*, 2011).

1.6 Biodisponibilidade

O ser humano não consegue sintetizar carotenóides, de modo que para poder tirar partido dos efeitos benéficos (atividade de provitamina A, capacidade antioxidante e fortalecimento do sistema imunitário) destes fitoquímicos terá de obtê-los através da dieta. O conceito de biodisponibilidade surgiu da tentativa de desvendar os fatores que contribuem para a incorporação, mais ou menos eficiente, dos carotenóides no organismo (Schumann *et al.*, 1997 *apud* Fernández-García *et al.*, 2011). De uma forma general, a biodisponibilidade refere-se à fração de compostos bioativos ingeridos que se tornam disponíveis para as funções fisiológicas ou para o armazenamento no organismo humano (Rodríguez-Amaya, 2010). Por outras palavras, a biodisponibilidade avalia a quantidade de um determinado composto libertado do alimento durante o processo de digestão e a sua assimilação, ou seja, corresponde à fração de uma dose oral de um composto ativo que alcança o sistema circulatório (Schumann *et al.*, 1997 *apud* Fernández-García *et al.*, 2011).

Com os estudos efetuados, o conceito de biodisponibilidade tem vindo a evoluir ao longo do tempo. Como resultado, foi já determinado que a biodisponibilidade inclui a acessibilidade para a absorção, a absorção em si, a metabolização, o transporte, a distribuição nos tecidos e a bioatividade, conforme descrito na figura 8 (Schumann *et al.*, 1997). Tendo como base este conhecimento, Faulks e Southon (2005) definiram as quatro principais etapas associadas à compreensão e medição da biodisponibilidade dos carotenóides: (a) libertação dos carotenóides da estrutura do alimento e passagem a uma forma potencialmente assimilável (bioacessibilidade), (b) passagem dos carotenóides do

lúmen do intestino para o organismo, (c) medição e interpretação da resposta do plasma e (d) interpretação das diferentes variações inter-individuais.

Posto isto, quando se fala de biodisponibilidade é importante distinguir a fase de digestão da fase de absorção: o processo de **digestivo** refere-se especificamente à fração dos componentes do alimento que são transformados, pela digestão, em matéria potencialmente acessível através de todos os processos físico-químicos que ocorrem no

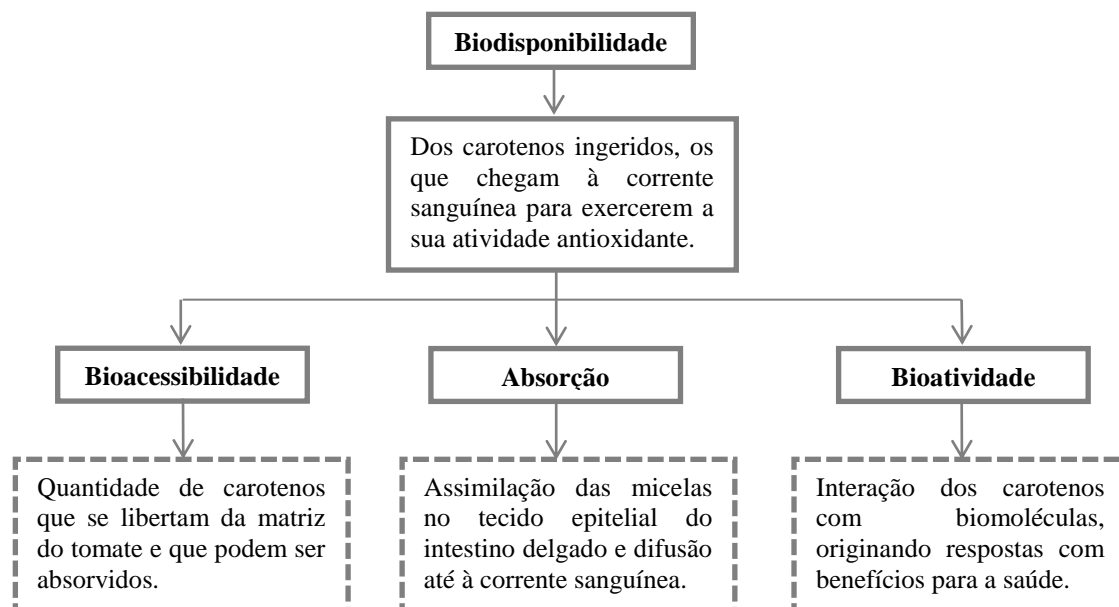


Figura 8 - Esquema simplificado do conceito de biodisponibilidade (adaptado de Fernández-García *et al.* (2009)).

lúmen; a **assimilação** (ou absorção) refere-se à captação de matéria bioacessível através do epitélio por via de mecanismos de absorção transepitelial (Fernández-García *et al.*, 2011). No estudo de carotenóides, alguns trabalhos que medem apenas as fases da digestão referem-se ao termo bioacessibilidade, enquanto os trabalhos que medem a assimilação assumem o termo biodisponibilidade. No entanto, a soma dos conceitos, digestão e assimilação, são frequentemente referidas como biodisponibilidade (Fernández-García *et al.*, 2011).

É frequente a publicação de estudos de biodisponibilidade de carotenóides através da determinação da quantidade de carotenóides no plasma após a ingestão de alimentos ou de suplementos, quer após uma única dose (estudo pós-prandial), quer num determinado período de tempo (estudo de suplementação). No entanto, a digestão e a assimilação envolvem uma série de etapas, e cada uma delas pode afetar o composto bioativo, de modo que o acontecimento real não é demonstrado num teste *in vivo*. Assim o processo *in vitro* torna-se mais apropriado para obter informações sobre os fatores que interferem nas

diferentes etapas da digestão e da assimilação, ou seja, da bioacessibilidade e da biodisponibilidade (Fernández-García *et al.*, 2011).

Como o já referido anteriormente, os estudos *in vivo* de biodisponibilidade não entram em linha de conta com a matriz do alimento, nem avaliam cada etapa do processo de absorção. Assim, surgem como alternativa complementar os modelos de digestão *in vitro*. Estes baseiam-se em modelos estáticos da simulação gastrointestinal e do trato digestivo humano e que reproduzem as condições fisiológicas do processo digestivo. Estes modelos são de fácil execução, podendo ser aplicados a um vasto número de amostras e em diferentes condições.

A avaliação da biodisponibilidade assume uma extrema importância na valorização do poder antioxidante do tomate em estudo, pois a legislação exige evidências científicas que comprovem as alegações da rotulagem dos géneros alimentícios. Concretamente, o Regulamento (CE) N.º 1924:2006 - Relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos – refere, entre outros aspetos, o seguinte: “ a utilização de alegações nutricionais e de saúde só é permitida se estiverem preenchidas as seguintes condições: a) ter sido demonstrado que a presença num género alimentício de um composto a respeito do qual é feita a alegação tem um efeito benéfico, estabelecido por dados científicos geralmente aceites; b) este tem de estar contido no produto final em quantidade significativa, estabelecido legalmente, ou por dados científicos geralmente aceites; c) o composto a respeito do qual é feita a alegação tem de se encontrar numa forma assimilável pelo organismo”.

1.7. Técnicas de análise com recurso à radiação eletromagnética

1.7.1 Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria é num dos mais antigos métodos óticos utilizados em química analítica. Surgiu como uma forma de calcular a concentração de substâncias químicas a partir das suas propriedades de absorção da luz (Marczenko e Balcerzak, 2000). A absorção de luz pelos materiais foi primeiramente explorada pelo matemático alemão Johann Heinrich Lambert (1728-1777), que descobriu que para a radiação monocromática a quantidade de luz absorvida era diretamente proporcional ao comprimento da trajetória da luz através do material e era independente da intensidade da luz incidente. Posteriormente, o astrónomo alemão Wilhelm Beer (1797-1850) expandiu este trabalho e

descobriu que para soluções diluídas existe uma relação linear entre a concentração do analito e a absorvância (Flanagan et al., 2007).

A luz consiste numa forma da radiação electromagnética, composta por uma mistura de ondas com diferentes comprimentos de onda. Como se encontra ilustrado na figura 9, o comprimento de onda (λ) é obtido pela distância entre duas cristas da onda, sendo a unidade o nm (10^{-9} m). As cores sentidas pela visão humana correspondem a um determinado comprimento de onda compreendido na região do visível. Nos métodos espectrofotométricos recorre-se frequentemente às regiões da radiação electromagnética ultravioleta (UV, 185-400 nm), visível (400-700 nm) e infravermelha (IV, 700-15000 nm) (Poole e Kalnenieks, 2000). Na figura 9 estão representados os espectros de radiação eletromagnética, com destaque para os comprimentos de onda da região do visível.

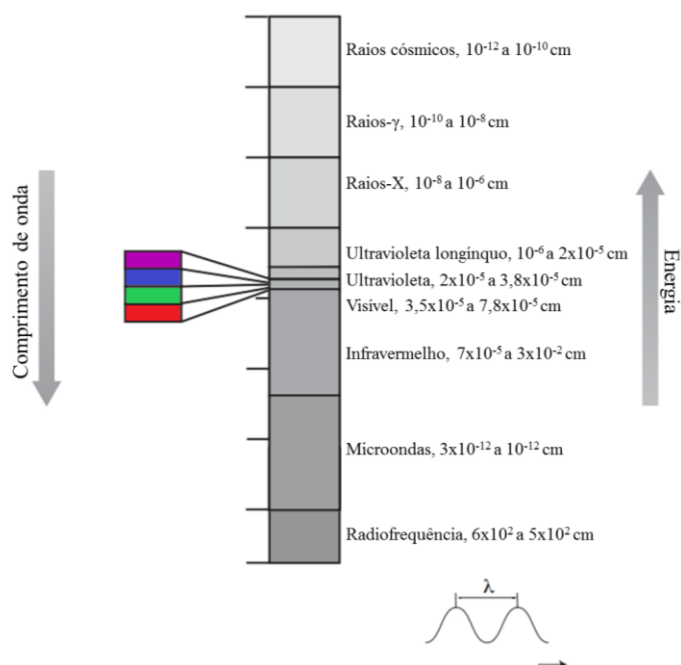


Figura 9 – Espectro de radiação eletromagnética (adaptado de University of Colorado at Boulder, 2002).

A absorção de diferentes tipos de radiação irá produzir diferentes efeitos: as radiações UV e visível excitam os elétrons do seu estado fundamental para um estado superior de energia (excitado); a radiação IV produz vibrações moleculares (Flanagan *et al.*, 2007).

Para a análise de compostos inorgânicos recorre-se com frequência às radiações UV/VIS, enquanto para compostos orgânicos é mais usual recorrer à radiação UV. Para além de quantificar compostos, a espectrofotometria permite determinar a composição de

compostos químicos, as constantes de dissociação de ácidos e de bases, ou as constantes de estabilidade de compostos complexos (Marczenko e Balcerzak, 2000).

1.7.2 Lei de Lambert-Beer

As medições espectrofotométricas são normalmente efetuadas a soluções (aquosas ou em solventes orgânicos) e são introduzidas em células de medição (cuvetes) que, por sua vez, são introduzidas na trajetória da emissão da radiação monocromática de um determinado comprimento de onda (Marczenko e Balcerzak, 2000).

Da radiação total de intensidade I_0 que incide sobre a solução, uma fração do feixe ao passar pela solução é absorvido (I_a), outra fração é transmitida (I_t) e uma outra parte é refletida (I_r) pelas paredes da cuvette, difundindo-se:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

Tendo em conta que as leituras são efetuadas por comparação com uma solução standard e que ambas são colocadas em cuvetes iguais, a radiação refletida é constante e pode ser ignorada (Marczenko e Balcerzak, 2000).

Para o cálculo da transmitância apenas se utilizam a radiação que incide sobre a solução (I_0) e a fração transmitida (I_t), sendo o resultado, normalmente, expresso em percentagem:

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

No entanto, apenas a absorvância é proporcionalmente linear à concentração da solução. Um dos parâmetros de que depende a quantidade de radiação absorvida por uma solução é a espessura da mesma. A partir desta observação, em 1769 Lambert estabeleceu a formulação matemática desta relação que dita que “uma fração de luz absorvida por um meio transparente é independente da intensidade de incidência da luz e cada camada sucessiva do meio absorve uma fração igual de luz que atravessa a solução”. Matematicamente, o fenómeno de absorvância corresponde ao decréscimo exponencial da intensidade da luz ao longo do caminho percorrido pelo feixe de luz pela amostra, expressando-se da seguinte forma:

$$\log_{10} = \frac{I_0}{I_t} \text{ (Poole e Kalnenieks, 2000; Flanagan *et al.*, 2007)}$$

Em 1852 Beer desenvolveu a relação entre a absorvância e a concentração de soluções com cor ao verificar que “a quantidade de luz absorvida é proporcional ao número de moléculas absorventes da solução pela qual atravessa a luz”. Assim, na equação de Lambert-Beer estão contempladas os seguintes parâmetros:

$$A = \epsilon cl,$$

onde ϵ é a constante de molar de absorvidade (ou coeficiente de absorção, l/mol·cm), c é a concentração da espécie absorvente (M, ou mol/l) e l é a espessura da cuvete (cm) unidade) (Marczenko e Balcerzak, 2000).

Em suma, para uma solução com um soluto absorvente e um solvente transparente, a fração absorvida de luz incidente é proporcional ao número de moléculas de soluto no raio de luz (lei de Beer) e o comprimento da solução (lei de Lambert) (Flanagan *et al.*, 2007). Assim, a lei fundamental da espectrofotometria de Lambert-Beer dita que a absorção de radiação depende do número total de centros de absorção, determinados pela concentração da solução e a espessura da mesma.

Em termos práticos, se uma solução com cor obedece a esta lei, o gráfico $A = f(c)$ é uma reta que passa na origem, sendo conveniente que a concentração origine uma absorvância que não superior a 1 (a unidade) (Marczenko e Balcerzak, 2000).

1.7.3 Equipamento

O conjunto de componentes básicos que permite a análise e registo de absorções da radiação consistem na fonte de radiação, o monocromador, a cuvete/célula e o detetor com um sistema de tratamento de dados (ver figura 10).

No espectrofotómetro UV-Vis existem normalmente duas fontes de luz, uma de radiação visível (lâmpada de tungsténio ou tungsténio-halogénio) e outra de radiação ultravioleta (lâmpada de deutério). Esta radiação é direcionada para um monocromador (pode ser um prisma, uma grade de difração, ou filtros de interferência) que divide a luz nos respetivos comprimentos de onda, correspondentes às diferentes cores. De seguida, os diferentes comprimentos de onda passam pelo modulador (equipamento com feixe

duplo), que por sua vez divide a radiação em dois raios. Um deles passa pela célula com a amostra, e o outro passa pela célula de referência (o branco). Os raios são direcionados em simultâneo para uma lente convexa que os encaminha para o detetor (que pode ser um diodo, uma válvula fotomultiplicadora, ou uma fotocélula) que compara as duas intensidades e envia um sinal proporcional à intensidade de cada raio para o computador. É o logaritmo dessa intensidade que fornece uma quantificação designada de absorvância. Para radiação Vis podem usar-se cuvetes de plástico, já em UV é necessário cuvetes de vidro ou quartzo porque nesse comprimento de onda o plástico absorve radiação (Flanagan et al., 2007).

O fenómeno físico que ocorre pela incidência da radiação na amostra trata-se de uma excitação dos eletrões, através da interação dos fotões com a nuvem eletrónica. Na figura 11 pode visualizar-se uma representação da interação de um fotão com $8,254 \times 10^{-19} \text{ J}$ com uma nuvem eletrónica de uma molécula. Esta interação provoca uma absorção de energia que eleva o eletrão de um estado energético fundamental para um estado excitado. A diferença dos níveis de energia na molécula, $E_2 - E_1$, corresponde exatamente à energia do fotão.

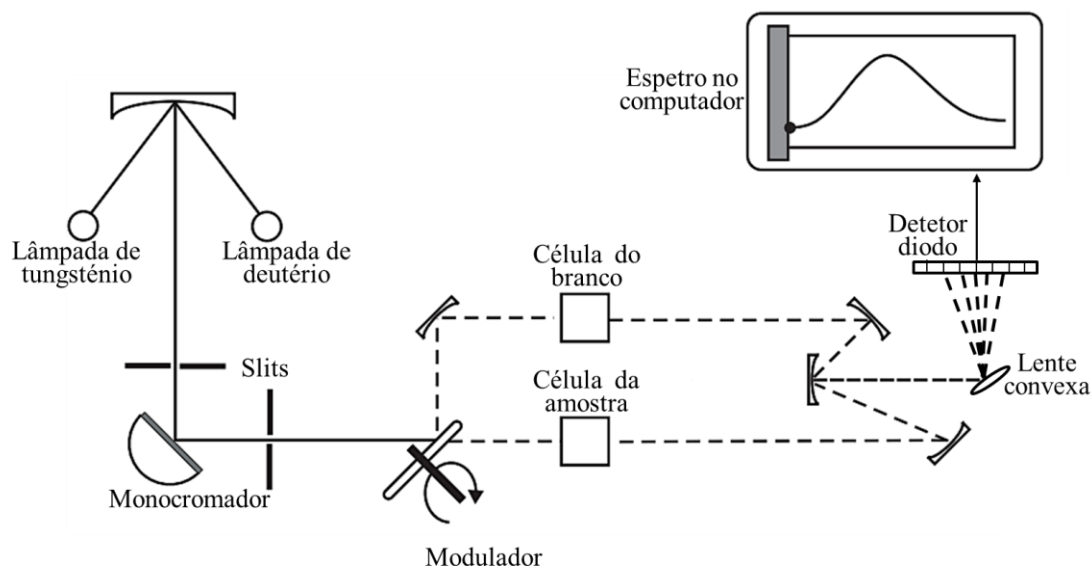


Figura 10 – Diagrama do sistema operacional do espectrofotômetro óptico de feixe duplo (adaptado de Flanagan et al., 2007).

Se se converter esta energia no comprimento de onda, este irá revelar que o processo de excitação ocorreu a 240 nm. Trata-se assim de uma transição eletrónica no espectro UV. Os espectros moleculares não derivam exclusivamente de uma única transição eletrónica entre o estado fundamental e o estado excitado. Ocorrem outras transições

quantificáveis entre o estado vibracional entre cada estado eletrónico e entre subníveis rotacionais. Deste modo, o comprimento de onda de cada absorção é dependente das diferenças entre os níveis de energia

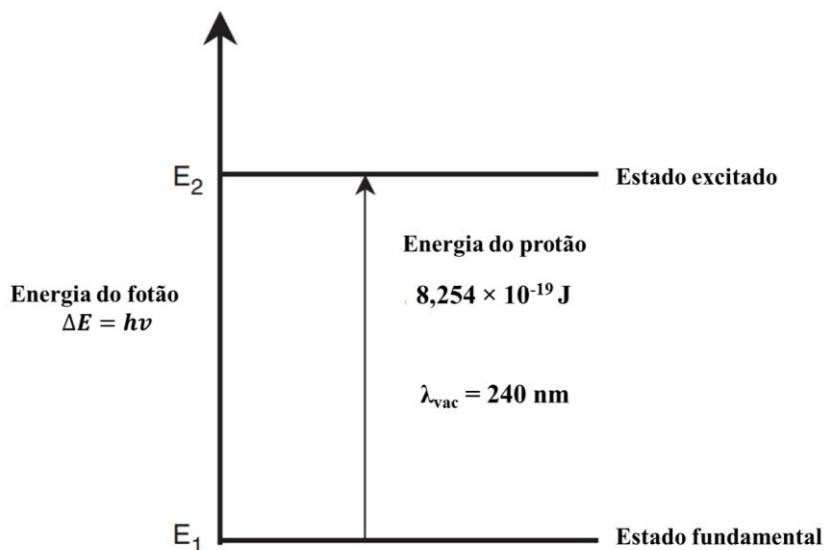


Figura 11 – Captura de um fóton por uma molécula (adaptado de Burgess, 2007).

. Algumas transições requerem menos energia e por isso aparecem em comprimentos de onda maiores. Na prática, mesmo as mais simples moléculas passam por vários níveis de energia, resultando num espectro complexo (Burgess, 2007).

1.7.4 Espectrofotometria aplicada aos carotenóides e clorofilas

A maioria destes compostos exibe uma absorção na região do espectro do visível, entre 400 e 500 nm, e o facto de obedecerem à lei de Beer-Lambert (absorvância linear à concentração) permite determinar a sua concentração numa amostra (Wrolstad *et al.*, 2001).

Na tabela 3 apresentam-se os comprimentos de onda de absorvância máxima para cada composto e a respetiva coloração.

Tabela 3 - Carotenóides e clorofilas presentes em tomate e respectivos comprimentos de onda máximos em éter etílico, éter de petróleo ou acetona 80% (adaptado de Porra et al., 1989, Rodriguez-Amaya, 200, Ötles e Çagindi, 2008 e Eijkelhoff e Dekker, 1997).

Composto	Comprimentos de onda (nm)	Solvente	Cor
Clorofila <i>a</i>	409, 429, 532, 577	Éter etílico	Verde
Clorofila <i>b</i>	430, 454, 594	Éter etílico	Verde
Feofitina	412, 431, 535	Acetona 80 %	Laranja
β -caroteno	425, 450, 477	Éter de petróleo	Laranja
β -zeacaroteno	454, 428, 406	Éter de petróleo	Laranja
δ -Caroteno	378, 400, 425	Éter de petróleo	Vermelho-laranja
Fitoflueno	331, 348, 367	Éter de petróleo	Incolor
γ -Caroteno	437, 462, 494	Éter de petróleo	Vermelho-laranja
Licopeno	444, 470, 502	Éter de petróleo	Vermelho
Violoxantina	416, 440, 465	Éter de petróleo	Amarelo
Neurosporeno	414, 439, 467	Éter de petróleo	Laranja
Zeaxantina	424, 449, 476	Éter de petróleo	Amarelo-laranja
ζ -Caroteno	431, 456, 489	Éter de petróleo	Amarelo claro

Esta absorvância e respetiva coloração devem-se à longa cadeia de ligações duplas conjugadas que por absorção num comprimento de onda compreendido entre 350 nm e 550 nm produz uma espectro característico de cada carotenóide. Apesar das características entre os espectros individuais de cada carotenóide serem semelhantes, as pequenas diferenças são importantes para a sua identificação. Na figura 12 encontram-se representados alguns espectros de carotenóides.

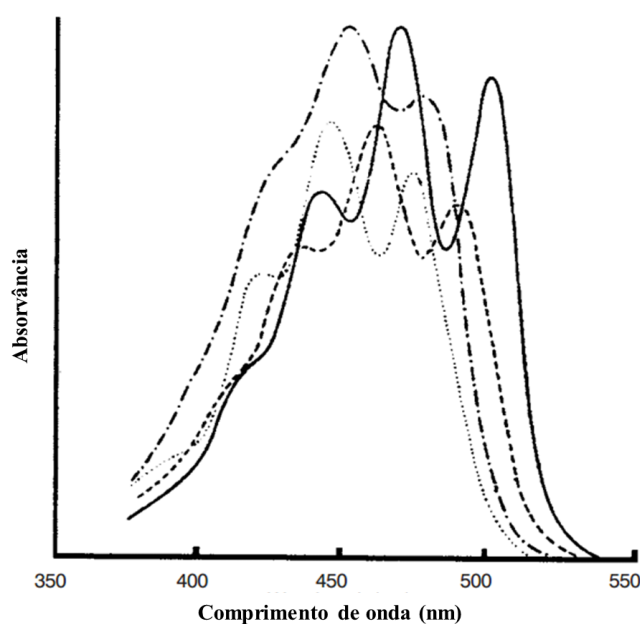


Figura 12 - Espectros de absorvância no visível do lycopeno (---), γ -caroteno (----), β -caroteno (-·-·-·-) e α -caroteno (....) em éter de petróleo (Adaptado de Rodriguez-Amaya, 2010).

Na preparação das amostras é necessário ter em especial atenção que os carotenóides são sensíveis à luz, à temperatura e ao oxigênio.

1.8 Espectroscopia Infravermelho Médio

No espectro da radiação eletromagnética a região do infravermelho situa-se entre 10 – 14000 cm^{-1} e é dividida em três regiões (ver figura 13): o próximo, o médio e o longínquo. A região do infravermelho próximo (400 – 4000 cm^{-1}) é a região comumente mais utilizada em análises, uma vez que nesta região todas as moléculas possuem frequências de absorvância e vibrações moleculares primárias características. A radiação infravermelha incide na amostra e certos comprimentos de onda específicos são absorvidos provocando vibrações nas ligações químicas da substância, como por exemplo alongamentos, contrações e flexões. Os grupos funcionais presentes nas moléculas tendem a absorver a radiação IV no mesmo número de comprimento independentemente das outras estruturas na molécula, e os picos do espectro são obtidos pelas diferentes absorções da energia vibracional das ligações na região do IV. Deste modo, existe uma correlação entre a posição na banda do IV e a estrutura química duma molécula. Para além disso, os espectros de IV podem também fornecer informação quantitativa dos grupos funcionais.

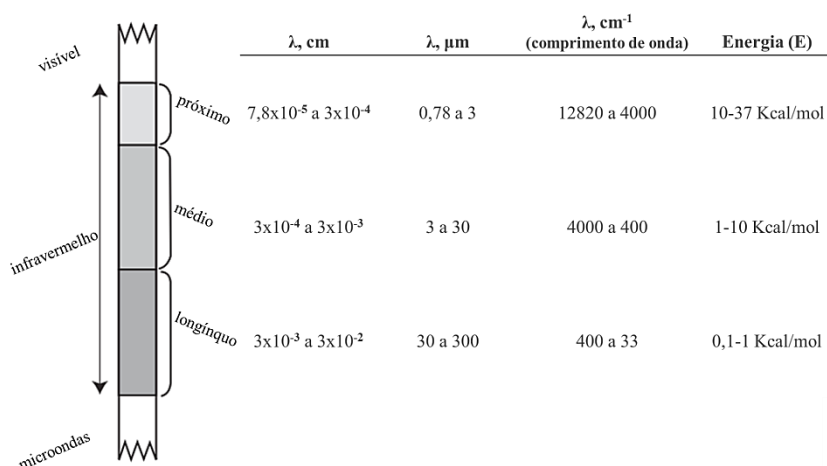


Figura 13 – Regiões do infravermelho do espectro eletromagnético (University of Colorado at Boulder, 2002).

À semelhança do espectro de UV-Vis, o espectro de IV é obtido pelo cálculo da intensidade de radiação IV antes e após atravessar a amostra, e o espectro possui normalmente a absorvância no eixo dos YY e o número de onda nos XX. O espectro de absorvância obtido por TF-IV segue a lei de Beer-Lambert, que como já foi explicado anteriormente, relaciona a concentração com a absorvância (Davis e Mauer, 2010).

1.8.1 Equipamento

Como se encontra representado na figura 14, a radiação emitida pela fonte do IV atravessa o interferômetro, vulgarmente com divisor de feixe (um filme semi-refletor, usualmente de brometo de potássio), seguidamente alcança o espelho fixo e depois o espelho rotativo. O interferômetro utiliza pedrões de interferência de modo a melhorar a precisão das medições do comprimento de onda da luz.

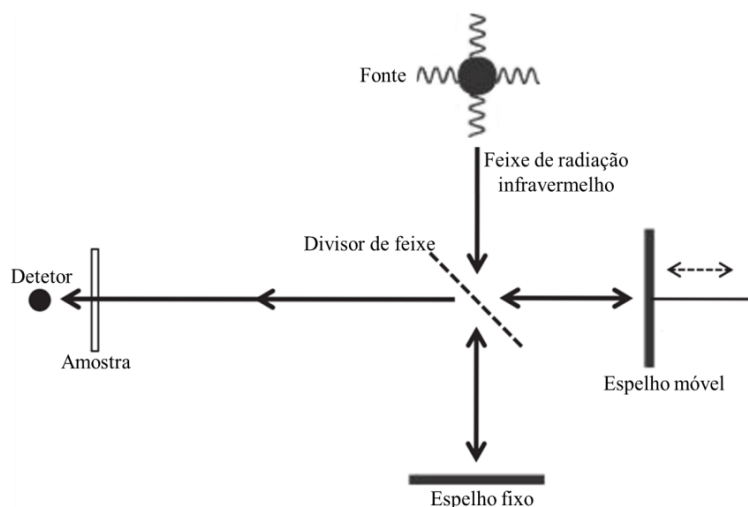


Figura 14 – Diagrama do sistema óptico do interferômetro de Michelson (adaptado de Smith, 2011).

Quando a radiação IV atravessa a amostra, parte da radiação é absorvida e a restante é transmitida para o detetor. O detetor mede o interferograma total dos diferentes comprimentos de onda da radiação IV. O interferograma (intensidade versus tempo do espectro) é depois convertido por uma função matemática (designada transformação de Fourier) num espectro IV (intensidade versus espectro de frequência) (Davis e Mauer, 2010).

1.8.2 Interpretação dos espectros de IV

Na maioria dos casos, o espectro fornece apenas parte da informação que se pretende e para que esta possa ser melhor interpretada é necessário recorrer a análises quimiométricas. A quimiometria consiste numa análise estatística dos dados obtidos pela análise química das amostras, permitindo extrair o máximo de informação dos espectros de IV. Dois dos métodos comumente mais utilizados são a análise de componentes principais (PCA, do inglês “principal component analysis”) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês “partial least squares regression”).

O PCA agrupa as amostras pelas características semelhantes, o que permite também distinguir as amostras entre elas. Na prática, o modelo encontra a principal fonte de variabilidade nos espectros das diferentes amostras e estabelece a relação entre semelhanças e variações (Duarte *et al.*, 2002; Xiaobo *et al.*, 2010). Visualmente as amostras ficam agrupadas em “clusters” no espaço multidimensional. O PLSR é utilizada para construir modelos de previsão para análises qualitativas e quantitativas. O modelo PLS extrai o máximo de informação do espectro baseado nas variáveis latentes ou nos fatores que são utilizados na calibração e na previsão.

Mesmo com estas sofisticadas ferramentas de quimiometria, é necessário ter em conta a influência dos dados que não contêm informação pertinente, pois podem comprometer o resultado dos modelos de calibração, uma vez que nem todas as variáveis ou as suas regiões são igualmente importantes para o modelo. Algumas destas variáveis, como zonas de ruído, podem mesmo representar um grande problema na criação do modelo (Xiaobo *et al.*, 2010). No entanto, estas questões podem ser facilmente ultrapassadas se forem criadas as condições necessárias para uma boa reprodutibilidade das réplicas (quer condições intrínsecas às amostras, quer condições derivadas da atmosfera ambiente – temperatura, gases na atmosfera, humidade relativa etc.).

1.8.3 Espectroscopia de IV aplicada à quantificação de açúcares

Devido à tecnologia ótica avançada e à elevada relação sinal/ruído, o recurso à técnica de IV permite detetar componentes individuais, assim como pequenas diferenças na composição entre amostras complexas. Esta técnica tem-se vindo a revelar interessante nos alimentos e bebidas para a determinação de compostos individuais de sabor, como a sacarose e a glucose (Vermeir *et al.*, 2009). No espectro de IV os açúcares absorvem na região 1200 - 970 cm^{-1} . O modelo quimiométrico de calibração multivariada PLS torna-se interessante para análises quantitativas de espectros devido à sua capacidade de redução do impacto de alguns problemas comuns, como colinearidade, sobreposição de bandas e interações (Xiaobo *et al.*, 2010). Este modelo delinea uma relação entre um conjunto de variáveis preditivas X (n objetos x k variáveis) e um conjunto de respostas variáveis Y (n objetos x m respostas). Na quantificação de açúcares apenas se avalia uma resposta, que corresponde à concentração de açúcar. Assim, as dimensões de Y são n objetos x 1 resposta. Baseado no modelo PLS, a concentração de açúcares foram previstas com um erro de previsão definido como % da raiz quadrada média do erro de previsão (RMSEP, do inglês “root mean square error of prediction”):

$$\text{RMSEP (\%)} = \frac{100}{\bar{y}} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \right)$$

Onde N = número de amostras, y_i corresponde à concentração atual, \hat{y}_i corresponde à previsão da concentração e \bar{y} corresponde à média das concentrações dos valores atuais (Duarte *et al.*, 2002).

A principal vantagem do PLS consiste no facto deste método conseguir lidar com dados de amostras fortemente correlacionadas (que é o caso dos espectros de sumo das diferentes amostras de tomate), por estabelecer uma calibração com variáveis latentes que são definidas como combinações lineares das variáveis originais (as concentrações de açúcar dos padrões). Estes fatores são extraídos de uma forma a terem a máxima covariância com as propriedades de interesse (os picos dos açúcares – glucose e frutose). Quando são usadas várias dependentes para a construção calibração as propriedades podem ser calibradas para um de cada vez usando o algoritmo PLS1, o que normalmente fornece modelos bastante precisos (Pedro e Ferreira, 2007).

2. Material e métodos

2.1. Recolha da amostragem

O tomate em estudo é produzido na Quinta da Azinhaga, que se localiza no concelho de Aveiro (consultar anexo II). A semente é de origem israelita e foi obtida a partir de um estudo de cruzamento de culturas.

O tomateiro é plantado segundo técnicas de enxertia e desenvolve-se em estufa. São aplicadas técnicas agronómicas de agricultura biológica - nomeadamente enraizamento com recurso a algas, polinização por abelhas Koppert e enriquecimento do solo com composto - e de biodinâmica (relacionado com as fases da lua). A temperatura mínima no interior da estufa varia entre 35 °C e 38 °C e mínima entre 10 °C e 12 °C. Nos primeiros 60 a 65 dias a planta não recebe qualquer nutriente, apenas composto e água, cuja frequência diária de rega depende da fase de desenvolvimento da planta.

O tomate Adina é um cultivar cereja que possui uma tonalidade laranja; o tomate Adara é um cultivar cereja oblonga de forte tonalidade amarela; o tomate Amonet é um cultivar cereja que possui uma tonalidade vermelha; o tomate Shir é um cultivar de calibre grande que possui uma tonalidade vermelha escura raiada de verde; o tomate Zebra é um cultivar cereja oblonga que possui uma tonalidade vermelha escura raiada de verde e o tomate Zmira é um cultivar cereja oval que possui uma tonalidade vermelha escura raiada de verde.

A recolha dos frutos iniciou-se quando estes já possuíam um calibre próximo do final e ainda possuíam uma tonalidade verde. Foram efetuadas cinco recolhas nas seguintes datas: dia 1 – 07.05.12; dia 11 – 17.05.12; dia 15 – 21.05.12; dia 19 – 25.05.12; dia 24 – 30.05.12. De modo a garantir que os frutos se desenvolveram sob as mesmas condições (nomeadamente de isolamento) as amostras foram todas recolhidas do patamar mais baixo da planta. O estado de maturação foi monitorizado pela evolução do tamanho e coloração do fruto.

Uma vez no laboratório, as amostras foram cuidadosamente lavadas, retirando-se os pedúnculos e partes do fruto danificadas. Procedeu-se à trituração e congelação a -24 °C.

As amostras mais maduras (dia 24) foram processadas por alta pressão (500 MPa, 5 minutos, à temperatura ambiente) a fim de verificar o impacto deste processamento no teor total de carotenos e na sua bioacessibilidade.

2.2. Análise em componentes principais dos espectros UV/Vis

Esta análise quimiométrica revela se o teor em carotenóides de cada cultivar confere discriminação entre as amostras. Ao realizar o PCA, as amostras aparecem no espaço multidimensional agrupadas pelas suas semelhanças.

2.2.1 Procedimento experimental

Recorrer a um software (OPUS, versão 2.06) para conversão dos espectros de formato Excel para formato Dx e, com recurso ao programa CATS (Barros, 1999), efetuar um pré-tratamento dos dados (centrar e padronizar por linhas e centrar por colunas). Escolher os componentes principais que corresponderem à melhor combinação de componentes para a separação/agrupamento das amostras. Registrar os scores e os loading de forma a posteriormente obter os gráficos do PCA (diagrama das coordenadas fatoriais e mapa das contribuições fatoriais) a partir da ferramenta Microsoft Excel.

2.3. Quantificação de carotenos (licopeno e β -caroteno)

O licopeno e o β -caroteno são responsáveis pela coloração do tomate, sendo a sua coloração vermelha e laranja, respetivamente. Deste modo, a partir das suas propriedades de absorção da luz, é possível recorrer a métodos óticos para o cálculo das respetivas concentrações. O método utilizado neste trabalho recorre assim à espectrofotometria UV-Vis, a partir da qual se obtêm os espectros de absorção da radiação visível das amostras. O comprimento de onda escolhido consiste no intervalo compreendido entre os 330 nm e 600 nm, pois é o intervalo descrito pela bibliografia para a absorção máxima dos carotenos em estudo (Rodriguez-Amaya, 2001).

No tratamento dos resultados, a quantificação dos carotenos na amostra pode ser efetuada, quer pela construção de uma curva de calibração, quer recorrendo a equações matemáticas pré-estabelecidas.

2.3.1. Curva de calibração de licopeno e de β -caroteno

Preparar uma solução mãe de licopeno em éter de petróleo (Fisher Scientific) de 4 $\mu\text{g/ml}$ e efetuar diluições (pipetas de vidro Normax, $\pm 0,05$ ml) com as seguintes

concentrações: 3 µg/ml; 2,4 µg/ml; 2 µg/ml; 1,6 µg/ml; 1,2 µg/ml e 0,8 µg/ml. Envolver os balões volumétricos em papel de alumínio e efetuar as leituras.

Selecionar o espectrofotômetro (Perklin Elmer, Lambda 35, UV/Vis) no comprimento de onda compreendido entre 330 e 600 nm, com “slit” 0,5 e intervalo 0,2. Efetuar a leitura do éter de petróleo como branco e recolher (pipeta automática Gilson, 1-5 ml, ± 0,6-1,2 %) o sobrenadante do tubo para uma cuvete de vidro. Limpar a cuvete de vidro com papel científico e efetuar a leitura da absorvância.

Registrar o pico máximo de absorvância de cada diluição a um comprimento de onda aproximado de 470 nm. Com os valores recolhidos construir a curva de calibração de concentração em função da absorvância, retirando a equação da linha de tendência.

Repetir o procedimento para o β-caroteno, sendo o comprimento de onda utilizado para a curva de calibração de 450 nm.

2.3.2 Extração e quantificação de licopeno e de β-caroteno no tomate

Este procedimento foi adaptado a partir do protocolo de Rajchl *et al* (2010) e Georgé *et al* (2011). Na câmara fria e protegido da luz, triturar meticulosamente o tomate com a varinha mágica (Braun turbo, 600 Watt), até não se verificarem fragmentos grosseiros de película. Tapar o copo e envolve-lo com papel de alumínio.

Introduzir 0,5 g (Balança Precisa, 40SM-200A ± 0.0001 g, Swiss Quality+) de tomate triturado nos tubos de speedvac (Centrífuga Univapo 100H, Trap Unicryo MC 2L - 60°C), previamente envolvidos em papel de alumínio. Adicionar a cada tubo 6 ml de acetona (Pantreac) e deixar na câmara fria (4°C) durante 30 minutos, agitando a cada 10 minutos. Introduzir os tubos no speed vac e aguardar (30-40 minutos) até que a acetona tenha evaporado praticamente na totalidade. Atenção, é importante deixar alguma água que permita manter a amostra humedecida. Adicionar a cada tubo 7-9 ml de éter de petróleo. Agitar e aguardar na câmara fria 30 minutos a 1 h com agitação a cada 10 minutos. Adicionar 2 ml de H₂O destilada e agitar cuidadosamente. Levar os tubos à centrífuga (Kubota 2010) a 250 rpm durante 5 minutos.

Selecionar o espectrofotômetro no comprimento de onda compreendido entre 330 e 600 nm, com “slit” 0,5 e intervalo 0,2. Efetuar a leitura do éter de petróleo como branco e recolher 3 ml do sobrenadante (pipeta automática Gilson, 1-5 ml, ± 0,6-1,2 %) do tubo para uma cuvete de vidro. Limpar a cuvete de vidro com papel científico e efetuar a leitura

da absorvância. Registrar os picos de absorvância para 450 nm e 470 nm e através da curva de calibração determinar a concentração de cada um dos carotenos.

Determinar também os picos para 450 nm, e 503 nm e aplicar a equação desenvolvida por Lime *et al.* (1957) (Georgé *et al.*, 2011):

$$C_{\beta\text{-caroteno}} = 4,624 \times A_{450} - 3,091 \times A_{503}$$

$$C_{\text{licopeno}} = 3,956 \times A_{450} - 0,806 \times A_{503},$$

onde C corresponde à concentração em µg/ml.

2.4 Análise da bioacessibilidade

Compreende-se por bioacessibilidade o processo de libertação dos carotenos da matriz do alimento durante o processo digestivo e a sua passagem a uma forma potencialmente assimilável pelo organismo. Trata-se assim de uma simulação *in vitro* dos processos fisiológicos que ocorrem na boca e no estômago. Na prática consiste na adição das enzimas digestivas (á-amilase, pepsina e pancreatina), sais biliares e reguladores de pH à temperatura de 37 °C, removendo-se o oxigénio a cada etapa (Faulks e Southon, 2005). No final quantificam-se os carotenos que, perante a matriz do tomate e mediante os fatores inerentes ao processo digestivo, permanecem com as suas propriedades antioxidantes. A quantificação é efetuada à semelhança do método anteriormente descrito, recorrendo-se à espectrofotometria UV/Vis.

Este procedimento foi adaptado a partir dos protocolos de McInerney *et al* (2007), de Werner e Bohm (2011) e de Nidhi e Baskaran (2010).

2.4.1 Bioacessibilidade *in vitro* - Simulação do impacto dos acontecimentos digestivos no licopeno e no β-caroteno do tomate

Preparar as seguintes soluções: 16,77 mg/ ml de á-amilase de *Bacillus subtilis* (Fulka biochemika, 62 U/mg) em H₂O destilada; 0,041 mg/ ml de pepsina de estômago suíno (Fluka biochemika, 170 U/mg) em HCl (Riedel-de Haën) 0,1 M e 0,2553 mg/ ml de pancreatina de pâncreas suíno (Sigma, 8U/mg) e bÍlis bovino (Fluka) em NaHCO₃ (Riedel-de Haën) 0,1 M.

Na câmara fria e protegido da luz, triturar grosseiramente o tomate com a varinha mágica (Braun turbo, 600 Watt). Tapar o copo e envolve-lo com papel de alumínio. Introduzir 1 g de tomate triturado nos tubos de centrífuga, previamente envolvidos em

papel de alumínio. Adicionar a cada tubo 200 µl de ácido L(+)-ascórbico (Merk) e 9,8 ml de cloreto de sódio (Riedel-de Haën). Aplicar o azoto e tapar imediatamente, deixando 5 minutos em banho termostaticado a 37°C (Grant Y28). Adicionar 1 ml de solução de α-amilase e ajustar o pH a 6,5. Aplicar o azoto e tapar imediatamente, deixando 2-5 minutos em banho termostaticado a 37°C. Adicionar 1 ml de solução de pepsina e ajustar o pH entre 1 e 4. Aplicar o azoto e tapar imediatamente, deixando 1-3 h em banho termostaticado a 37°C. Adicionar 3 ml de solução de pancreatina e sais biliares e ajustar o pH entre 3,5 a 5. Aplicar o azoto e tapar imediatamente, deixando 30 minutos em banho termostaticado a 37°C. Ajustar o pH entre 6,5 a 7 e aplicar o azoto, tapando imediatamente e deixando 2-7 h em banho termostaticado a 37°C.

Homogeneizar bem a solução final e recolher 3 ml para outros tubos de centrífuga. Adicionar a cada tubo 6 ml de clorofórmio. Centrifugar (Centrífuga Kubota 2010) 5 minutos a 4000 rpm. Recolher cuidadosamente as fases orgânicas para tubos de speed vac e evaporar o clorofórmio. A cada amostra seca adicionar 0,5 ml de acetona (Pantreac) e agitar vigorosamente até dissolver totalmente os carotenos. Seguidamente adicionar 4 ml de éter de petróleo e 4 ml de H₂O destilada, pela respetiva ordem. Recolher o sobrenadante para leitura no espectrofotómetro (Perklin Elmer, Lambda 35, UV/Vis).

2.4.2 Quantificação de carotenos bioacessíveis

Selecionar o espectrofotómetro no comprimento de onda compreendido entre 330 e 600 nm, com “slit” 0,5 e intervalo 0,2. Efetuar a leitura do éter de petróleo como branco e com recurso à pipeta de Pasteur recolher o sobrenadante do tubo para uma cuvete de vidro. Limpar a cuvete de vidro com papel científico e efetuar a leitura da absorvância.

Registrar os picos de absorvância para 450 nm e 470 nm e através da curva de calibração determinar a concentração de cada um dos carotenos.

Determinar também os picos para 450 nm, e 503 nm e aplicar a equação desenvolvida por Lime *et al.* (1957) (Georgé *et al.*, 2011):

$$C_{\beta\text{-caroteno}} = 4,624 \times A_{450} - 3,091 \times A_{503}$$

$$C_{\text{licopeno}} = 3,956 \times A_{450} - 0,806 \times A_{503},$$

onde C corresponde à concentração em µg/ml.

2.5. Atividade antioxidante pelo radical livre DPPH'

Neste método promove-se a reação entre o radical 2,2'-difênil-1-picril-hidrazilo (DPPH') em metanol e os compostos antioxidantes da amostra, com o objetivo de avaliar o seu poder antioxidante. Quando o DPPH' reage com um composto antioxidante, este último cede um elétron de hidrogênio, e o DPPH' é reduzido. Esta reação provoca alterações de cor, passando de violeta escuro a violeta claro (podendo até mesmo desaparecer), consoante o poder antioxidante do composto. A atividade antioxidante é obtida pela medição de cor no espectrofotômetro a 515 nm, após reação do DPPH' com a amostra. Obtém-se, assim um gráfico de % DPPH' restante em função da concentração da amostra. Quanto maior a diminuição da absorvância, menor é a percentagem de DPPH' restante no meio, o que representa um maior poder antioxidante dos compostos presentes na amostra. Os resultados são vulgarmente expressos em EC₅₀ ("Efficient Concentration"), que é definido como a quantidade de antioxidante necessário para provocar uma diminuição de 50% na concentração inicial de DPPH' (Prior *et al.*, 2005).

Este método foi adaptado a partir de Capanoglu *et al.* (2008) e Rufino *et al.* (2007)

2.5.1 Curva de calibração do radical livre DPPH'

Preparar no próprio dia do ensaio uma solução-mãe de DPPH' 100 µM (Sigma) em metanol (Fisher Scientific) e guardar no escuro. A partir desta solução preparar soluções de DPPH' com as seguintes concentrações 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µM. Efetuar as leituras a 515 nm (espectrofotômetro Jenway-6405 UV/Vis) com soluções de diversas concentrações de DPPH' (20 – 80 µM) e construir uma curva de calibração (Abs₅₁₅ vs concentração). Utilizar o metanol como branco para calibrar o espectrofotômetro.

2.5.2 Atividade antioxidante do tomate pela captura do radical livre DPPH'

Introduzir 1 g de tomate num tubo de ensaio com tampa de rosca e adicionar 4 ml de etanol 70% (Carlo Erba). Deixar de repouso e protegido da luz durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Centrifugar (Kubota 2010) a 4000 rpm, 5 minutos e, a partir do sobrenadante (cujas concentrações são de 250 mg/ml), preparar as seguintes diluições: 20 mg/ml, 50 mg/ml, 70 mg/ml e 100 mg/ml. Em porta amostras de 5 ml, revestidos de papel de alumínio, adicionar 0,1 ml de cada solução de extrato de tomate (para cada uma das concentrações) e 3,9 ml de DPPH' de concentração 60 µM. Guardar no escuro durante 30

minutos e ler a absorvância a 515 nm. Construir o gráfico % DPPH[•] restante *versus* concentração das soluções de extrato de tomate. Em paralelo, preparar o controlo pela adição de 0,1 mL de etanol 70% e 3,9 ml de DPPH[•] 60 µM. Guardar no escuro durante 30 minutos e ler a absorvância a 515 nm, utilizando o metanol como branco para calibrar o espectrofotómetro.

2.6. Determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico

Este método baseia-se na degradação dos açúcares por ácido forte e/ou temperaturas altas, que levam à produção de derivados de furano, que por sua vez condensam, produzindo substâncias de cor castanha e preta (BeMiller, 2010). Quanto maior a intensidade da cor, maior a concentração de açúcares, podendo esta concentração ser determinada por espectrofotometria, medindo-se a absorvância a 490 nm, após a reação.

Este método foi baseado em (DuBois *et al.*, 1956) sendo introduzidas algumas modificações.

2.6.1 Curva de calibração dos açúcares

Preparar soluções padrão de D-glucose (Riedel-de Haën) e D-frutose (Sigma) 1:1 com as seguintes concentrações: 150 µg/ml, 300 µg/ml, 450 µg/ml e 600 µg/ml.

Transferir uma alíquota de 100 µl de cada diluição da solução glucose e frutose para tubos de ensaio e adicionar 1 ml da solução de fenol (Sigma) e 2,5 ml da solução de ácido sulfúrico concentrado (Sigma). Homogeneizar no vortex (IKA, lab dancer), tapar com papel de alumínio e levar 10 minutos ao banho termostaticado (Gesellschaft für Labortechnik mbH D3006). Seguidamente, deixar arrefecer em banho de água fria e após estabilização da temperatura, efetuar a leitura no espectrofotómetro (Jenway, 6405 UV/Vis) a 490 nm. Para obter a curva de calibração construir o gráfico da concentração de açúcares em função da absorvância.

2.6.2 Quantificação dos açúcares totais do tomate

Paralelamente à preparação das soluções de açúcar, triturar (varinha mágica, Braun turbo, 600 Watt) meticulosamente o tomate e filtrar (filtro de, porosidade ≈ 0,5 m) o sumo. Após a filtragem, levar o sumo à centrífuga (400 rpm, 5 minutos) e recolher o

sobrenadante. Seguidamente, verificar qual o fator de diluição que melhor se adapta à curva de calibração (em princípio devese estar entre 1:50 e 1:150).

Em simultâneo com os padrões de açúcar, transferir uma alíquota de 100 µl do sumo diluído para tubos de ensaio e adicionar 1 ml da solução de fenol e 2,5 ml da solução de ácido sulfúrico concentrado. Homogeneizar no vortex, tapar com papel de alumínio e levar 10 minutos ao banho termostatizado. Seguidamente, deixar arrefecer em banho de água fria e após estabilização da temperatura, efetuar a leitura no espectrofotómetro a 490 nm. A partir da curva de calibração determinar a concentração de açúcares redutores das amostras.

2.7. Determinação de açúcares redutores pelo método DNS

Este método baseia-se na oxidação do grupo aldeído ($H - C = O$) dos açúcares redutores e simultânea redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em ácido 3-amino,5-nitrosalicílico. A monoamina produzida possui uma cor avermelhada de absorvância máxima a 540 nm, o que permite a quantificação dos açúcares redutores por espectrofotometria (BeMiller, 2010).

Este método foi baseado em Miller (1959) sendo introduzidas algumas modificações.

2.7.1 Curva de calibração dos açúcares redutores do tomate

Para a preparação do reagente DNS (Aldrich) proceder do seguinte modo: adicionar 5 g de DNS a 100 ml de hidróxido de sódio 2 M (NaOH, Merck). Aquecer sob agitação até completa dissolução do sal. Paralelamente, aquecer e aproximadamente 125 ml de H₂O destilada e agitar até à dissolução. Posteriormente, adicionar 150 g do sal de Rochelle (KNaC₄H₄O₆·4H₂O, Carlo Erba) a 250 ml de H₂O destilada e aquecer sob agitação (IKA, placa MSC Basic C, termómetro TC3) até completa dissolução. Num balão de 500 ml juntar a quente as duas soluções, lentamente e com agitação e perfazer o volume com H₂O destilada. Este reagente é instável na presença de luz e CO₂, pelo que deve ser conservado em local escuro e com o frasco devidamente rolhado.

.Preparar soluções padrão de glucose e frutose 1:1 com as seguintes concentrações: 150 µg/ml, 300 µg/ml, 450 µg/ml, 600 µg/ml, 675 µg/ml e 750 µg/ml.

Transferir uma alíquota de 500 µl de cada diluição da solução glucose e frutose para tubos de ensaio e adicionar 500 µl da solução de DNS. Homogeneizar no vortex (IKA, lab dancer), tapar com papel de alumínio e levar 5 minutos ao banho termostatizado (Gesellschaft für Labortechnik mbH D3006).. Seguidamente adicionar 5 ml de H₂O destilada e homogeneizar no vortex. Deixar arrefecer em banho de água fria, e após estabilização da temperatura, efetuar a leitura no espectrofotómetro (Jenway, 6405 UV/Vis) a 540 nm. Para obter a curva de calibração construir o gráfico da concentração de açúcares em função da absorvância.

2.7.2 Quantificação dos açúcares redutores

Paralelamente à preparação das soluções de açúcar, triturar meticulosamente (varinha mágica, Braun turbo, 600 Watt) o tomate e filtrar (filtro de, porosidade ≈ 0,5 m) o sumo. Após a filtragem, levar o sumo à centrífuga (400 rpm, 5 minutos) e recolher o sobrenadante. Seguidamente, verificar qual o fator de diluição que melhor se adapta à curva de calibração (em princípio devesa estar entre 1:50 e 1:150).

Em simultâneo com os padrões de açúcar, transferir uma alíquota de 500 µl do sumo de tomate diluído para tubos de ensaio e adicionar 500 µl da solução de DNS. Homogeneizar no vortex, tapar com papel de alumínio e levar 5 minutos ao banho termostatizado. Seguidamente adicionar 5 ml de H₂O destilada e homogeneizar no vortex. Deixar arrefecer em banho de água fria, e após estabilização da temperatura, efetuar a leitura no espectrofotómetro (Jenway, 6405 UV/Vis) a 540 nm. A partir da curva de calibração determinar a concentração de açúcares redutores das amostras.

2.8. Quantificação de glucose e frutose no tomate por IV

A espectroscopia de infravermelho permite analisar os açúcares do sumo de tomate de forma rápida e pouco evasiva. Para isso é necessário construir uma curva de previsão com concentrações conhecidas de glucose e de frutose, e paralelamente efetuar leituras no sumo de tomate. A incidência da radiação na zona do infravermelho médio na amostra induz à excitação das moléculas, que por sua vez o provoca uma vibração dos grupos funcionais das mesmas. O equipamento faz uma leitura das vibrações e a informação é posteriormente tratada por quimiometria (PLS, do inglês “partial least squares regression”), de modo a quantificar o teor de glucose e de frutose no tomate.

2.8.1 Modelo de previsão dos teores de glucose e de frutose

Para a construção da curva de previsão dos teores de açúcar no tomate preparar soluções de açúcar com as seguintes concentrações:

Glucose (mg/ml)	Frutose (mg/ml)
3	40
7	15
10	30
15	25
20	10
25	7
30	35
35	20
40	3
22	11

Introduzir uma gota de 50 μl do padrão de açúcar no espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX). Iniciar a leitura com uma resolução de 8 cm^{-1} e 64 varrimentos, na região do infravermelho médio (região compreendida entre 1200 e 970 cm^{-1}). Ler cada padrão em triplicado, introduzindo uma nova gota para solução e entre cada leitura limpar cuidadosamente o cristal com água destilada. Uma vez obtidos os espectros dos padrões, efetuar a análise quimiométrica PLS com recurso ao software adequado (CATS build 97, desenvolvido por Barros (1999)). Criar as matrizes para cada açúcar, através de um pré tratamento dos padrões (centrar e padronizar por linhas). Introduzir as amostras, definir a matriz dos padrões como eixo dos xx e as amostras como eixo dos yy e proceder à validação cruzada. Os gráficos devem posteriormente obtidos a partir da ferramenta Microsoft Excel.

2.8.2 Quantificação de glucose e de frutose no tomate por espectroscopia de infravermelho

Triturar meticulosamente (varinha mágica, Braun turbo, 600 Watt) o tomate e filtrar (filtro de, porosidade $\approx 0,5 \text{ m}$) o sumo. Após filtragem, levar o sumo à centrífuga (400 rpm, 5 minutos) e recolher o sobrenadante.

Introduzir uma gota de 50 µl (pipeta automática automática Gilson, 200-1000 µl, ± 1,5-0,8 %) de sumo de tomate no acessório do espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX). Iniciar a leitura com uma resolução de 8 cm⁻¹ e 64 varrimentos, na região do infravermelho médio (região compreendida entre 4000 e 600 cm⁻¹). Através do modelo de PLS montado, introduzir os espectros de sumo obtidos a fim de obter a informação dos teores de glucose e frutose.

2.9. Determinação do extrato seco

O cálculo do extrato seco tem como base a determinação da massa de água da amostra. Este método baseia-se assim no ponto de ebulição da água, que no seu estado puro corresponde a 100 °C. Tendo em conta que os sólidos solúveis da matriz alimentar aumentam o ponto de ebulição da água (1mol de soluto dissolvido em 1 l de água aumenta o ponto de ebulição em cerca de 0,512 °C), a temperatura necessária para secar totalmente a amostra terá necessariamente de ser superior a 100 °C (Bradley, 2010). Este método desenvolvido a partir de Wrolstad *et al.* (2001).

2.9.1 Procedimento experimental

Levar as caixas metálicas de pesagem à estufa a 105 °C (Venticell, Standard line), durante uma hora. Transferir cuidadosamente para o exsiccador e aguardar 30 minutos até as caixas se encontrarem à temperatura ambiente. Registrar a massa (Balança Precisa, 40SM-200A ± 0.0001 g, Swiss Quality+) de cada caixa e introduzir aproximadamente 3 g de cada amostra. Colocar as caixas abertas na estufa a 105 °C e deixar 12 h até completa evaporação da água. Seguidamente, transferir as caixas fechadas para o exsiccador e aguardar 30 minutos até as caixas se encontrarem à temperatura ambiente. Efetuar o registo da massa de cada caixa com a amostra seca.

O teor de água e o extrato seco são obtidos pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Percentagem de água} = \frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} \times 100$$

$$\text{Percentagem de extrato seco} = 100 - \left(\frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} \times 100 \right)$$

Em que:

M₁- massa da caixa vazia (g)

M₂- massa da caixa com a amostra fresca (g)

M₃- massa da caixa com a amostra seca (g)

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização da extração e quantificação dos carotenos

Da pesquisa efetuada, verificou-se que na extração dos carotenos do tomate são frequentemente usados dois tipos de combinações de solvente: uma mistura de acetona/etanol para a ruptura celular e hexano para a extração dos carotenos e outra combinação de acetona para a ruptura celular e éter de petróleo para a extração dos carotenos. Optou-se pela segunda combinação, pois, segundo Georgé *et al.* (2011), a extração com recurso a acetona e éter de petróleo é mais eficiente.

Vários métodos recorrem à filtração e à extração em funil de decantação, no entanto verificou-se que procedimento resulta em perdas significativas dos carotenos. Por maior que seja o cuidado em manter a amostra ao abrigo da luz, com este procedimento ocorre sempre oxidação pela luz e pela elevada exposição dos carotenos ao oxigénio. Assim sendo, optou-se por recorrer unicamente a um tubo revestido por papel de alumínio, em que a separação das fases é feita por centrifugação e lavagem com água destilada. O sobrenadante era apenas recolhido no momento da leitura, evitando ao máximo danos oxidativos no extrato da amostra.

Um outro aspeto não menos importante, que se apurou na otimização deste método, foi a solubilização da acetona no éter de petróleo. Segundo a bibliografia consultada, a acetona é miscível em éter de petróleo, mas terá maior afinidade com a água. Por esse motivo, após a extração adiciona-se água para “lavar” o éter de petróleo. No entanto, pela disparidade entre as réplicas na quantificação de carotenos, concluiu-se que os volumes finais dos extratos sofriam variações devido a alguma acetona que permanecia no éter de petróleo em quantidades variáveis. De modo a colmatar essa situação, optou-se por evaporar a acetona após a ruptura celular, no evaporador rotativo.

3.2. Otimização da quantificação dos carotenos na bioacessibilidade

A maior dificuldade encontrada na metodologia de bioacessibilidade *in vitro* prendeu-se com a quantificação final dos carotenos. Inicialmente, foi utilizado éter de petróleo para extrair os carotenos, no entanto este solvente não conseguia reter qualquer caroteno. Aparentemente o produto resultante da “digestão” era imiscível com o éter de

petróleo. Por conseguinte, recorreu-se ao solvente indicado por (McInerney *et al.*, 2007), o hexano. Com este solvente o problema permaneceu, pelo que se avançou para o clorofórmio, que segundo Rodriguez-Amaya (2001) é também um solvente passível de ser usado em carotenóides.

Tendo em conta que os resultados da bioacessibilidade são no final comparados com a quantificação (total) de carotenos no tomate, não seria coerente comparar resultados em solventes diferentes. Assim, evaporou-se o clorofórmio no evaporador rotativo e posteriormente dissolveram-se os carotenos em éter de petróleo.

3.3. Análise qualitativa dos espectros UV/Vis

A cada cultivar de tomate foi efetuado uma extração de carotenos, a partir dos quais se obtiveram espectros de absorvância no visível. A partir dos espectros de cada cultivar de tomate, efetuou-se uma análise multivariada (PCA) para verificar se as amostras apresentavam diferenças significativas entre elas.

No tomate do dia 1 não foi encontrada discriminação entre as amostras no PCA, no entanto, com o avançar do estado de maturação as amostras foram-se agrupando. No dia 1 os tomates estavam verdes, e desta forma o que predominava no espectro visível era a absorção das clorofilas. O PCA das amostras do tomate com 24 dias de maturação encontra-se representado na figura 15 e o mapa das contribuições fatoriais na figura 16.

Os resultados refletem com clareza as diferenças e as semelhanças que já se observavam visualmente (ver figura 17). O tomate Adina e o Adara possuem tonalidades laranja claro, o que faz previsível que tenha um tipo carotenos semelhante, comparativamente com os restantes frutos. O tomate Zebra e Zmira confundem-se a visualmente e a sua semelhança reflete-se no PCA pela proximidade e até sobreposição das réplicas dos dois cultivares. O Amonet situa-se entre Vulgar e os Zebra e Zmira, embora mantendo a sua individualidade. O Shir é o único fruto que não é cereja, embora a sua coloração seja semelhante aos frutos Zmira e Zebra, o que possivelmente explica a sua ligeira aproximação destes no PCA

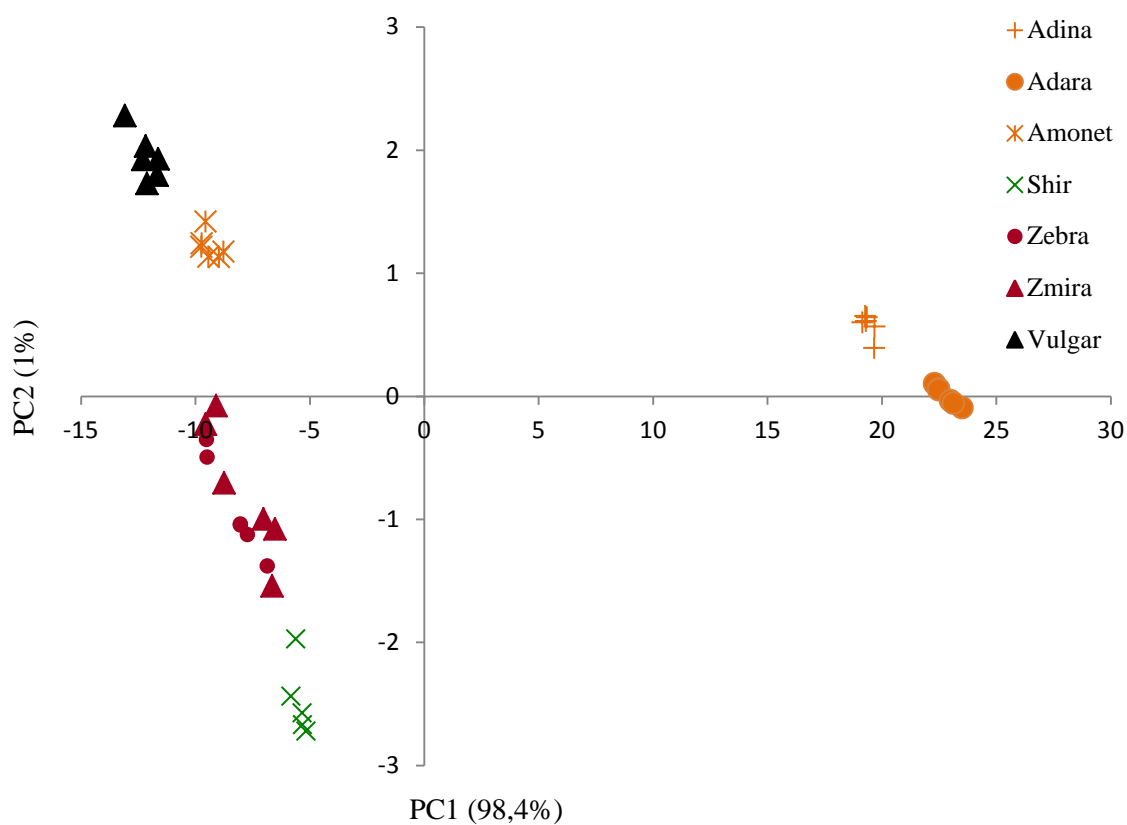


Figura 15 - Diagrama das coordenadas fatoriais (PC1 vs PC2) das diferentes cultivares de tomate, no dia 24 (tomate maduro).

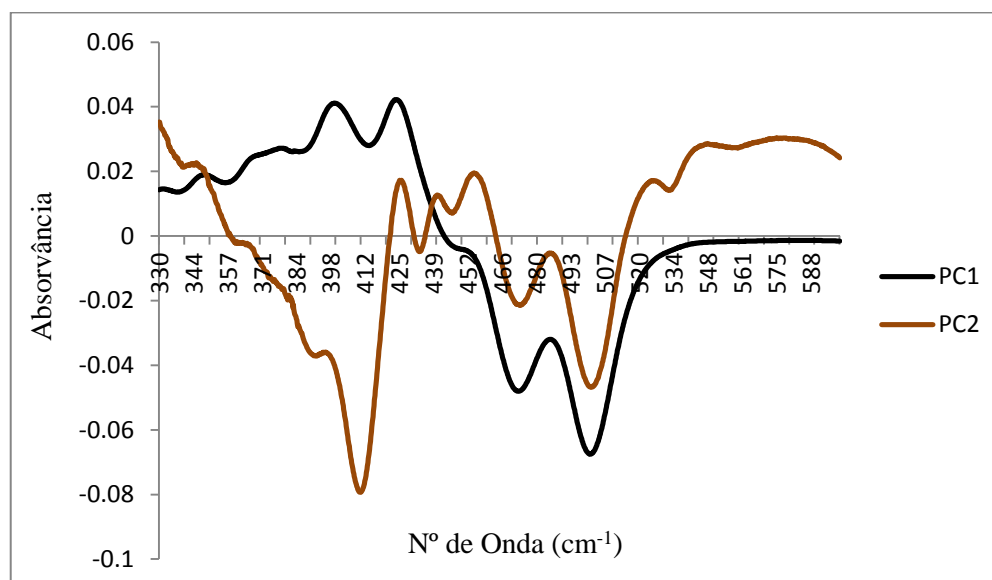


Figura 16- Mapa das contribuições fatoriais dos cultivares Adina, Adara, Amonet, Shir, Zebra, Zmira e vulgar, no dia 24 (maduros.)

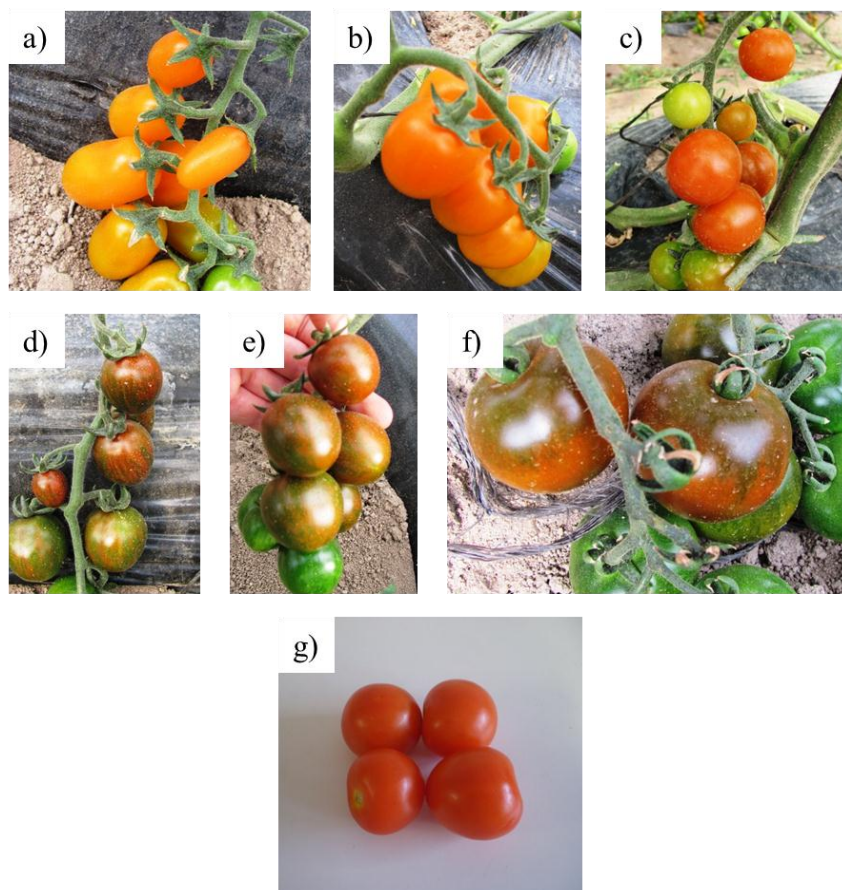


Figura 17 – Na figura estão representados os cultivares em estudo e uma vulgar, no dia 24. Legenda: a) Adina; b) Adara; c) Amonet; d) Zebra; e) Zmira; f) Shir e g) vulgar.

De modo a obter uma melhor compreensão da composição em carotenos do tomate em estudo, optou-se por realizar uma avaliação metódica do perfil dos espectros de todas as amostras, com o recurso à deconvolução dos espectros das amostras do dia 1 e dia 24. Apresentar-se-á de seguida, para cada cultivar, uma descrição do que se apurou dos espectros de absorvância UV/Vis (com o auxílio da tabela 3 da página 30).

3.3.1 Cultivar Adina

Uma análise atenta ao perfil do espectro deste cultivar revelou que o tomate Adina apresenta diversos carotenóides. Comparando os espectros dos padrões com o espectro de Adina no primeiro dia (fruto verde) verifica-se que os picos mais intensos da amostra não têm uma correspondência direta com os padrões. Após pesquisa bibliográfica atribuiu-se o pico de 410 nm (máxima) à feofitina *a*. Efetuando uma deconvolução do espectro de uma amostra do dia 1 (figura 18) é possível atribuir os picos às clorofilas *a* e *b* e a carotenóides.

Desta forma a interpretação do espectro é a seguinte: fitoflueno (330, 351 e 368 nm)¹, ζ -caroteno (378, 400 e 425 nm), feofitina *a* (410, 433, 532 nm), clorofila *a* (412, 433, 506 e 533 nm) e clorofila *b* (433, 460 nm). Estima-se que exista licopeno (500, 470, 444 nm) e β -caroteno (425, 447 e 470 nm) e/ou zeaxantina cujos picos de absorção são muito próximos dos do β -caroteno (tabela 3, p. 30).

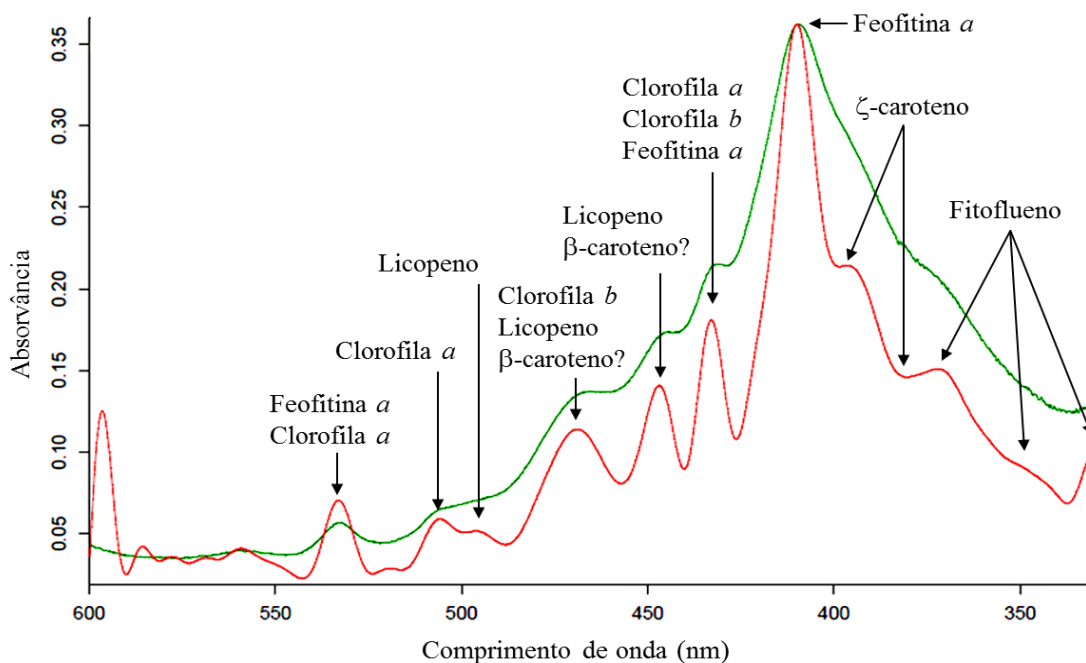


Figura 18 – Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm do cultivar Adina no primeiro dia (—) e a respetiva deconvolução (—).

O perfil das amostras do Adina mantém-se semelhante até ao dia 15 de maturação (3^a recolha de amostras). Todavia, os picos da feofitina e das clorofilas perdem preponderância, como se pode ver na figura 20, em que se observa uma ampliação do pico a 535 nm dos dias 1, 11 e 15, notando-se que esta banda diminui com o tempo. Por outro lado é visível que começam a destacar-se picos em comprimentos de onda correspondentes a carotenóides. Possivelmente a concentração de fitoflueno e ζ -caroteno estarão a aumentar, uma vez que os espectros da amostra do dia 15 aumentam na região que contempla os comprimentos de onda de absorção dos referidos carotenos. Ao dia 19 de maturação verifica-se uma alteração significativa do espectro da amostra, que reflete a alteração do conteúdo de carotenos (figura 19).

¹ Os valores em parêntesis correspondem aos picos encontrados nos espectros das amostras e que têm correspondência com os valores encontrados na literatura para carotenos e clorofilas (tabela 3, p. 30).

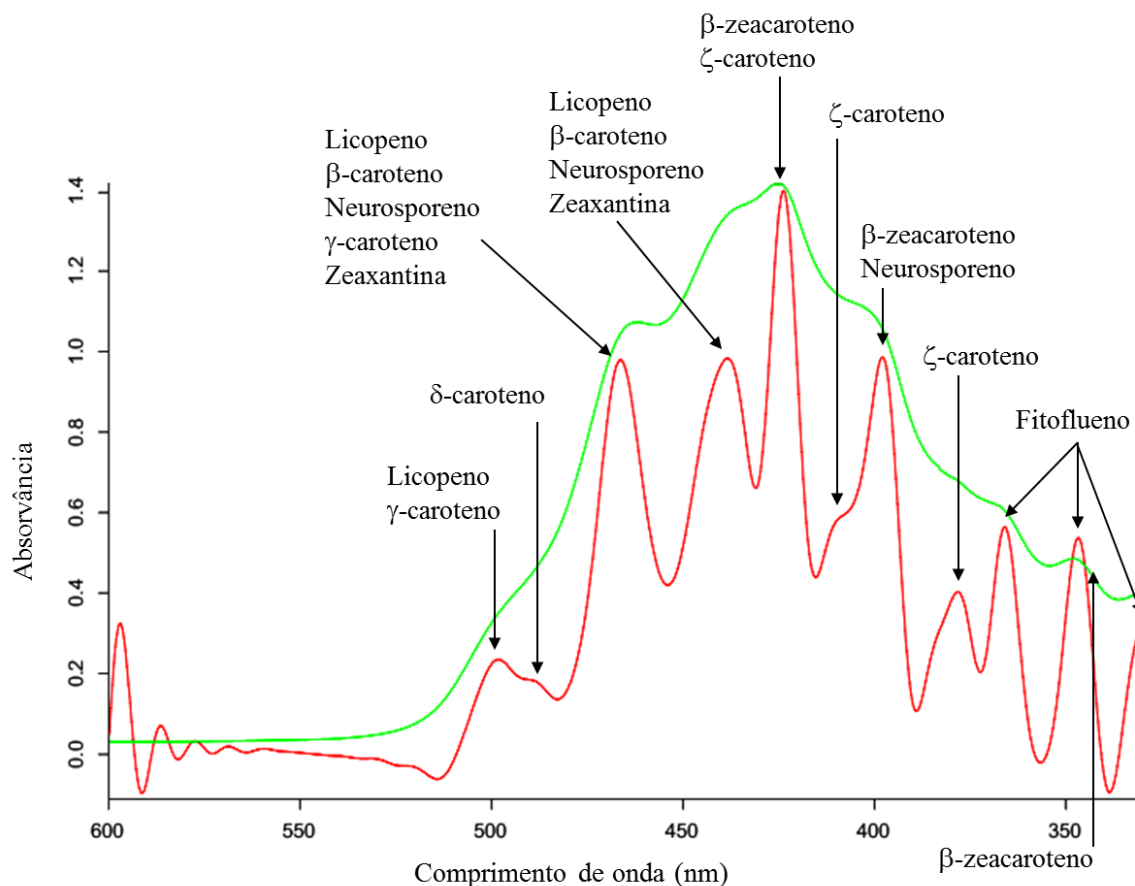


Figura 19 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm do cultivar Adina no 24º dia (—) e a respetiva deconvolução (—).

Aos 24 dias apenas aumenta a intensidade dos picos. Os picos correspondentes às clorofilas e à feofitina desaparecem do espectro. O fitoflueno (368, 347 e 331 nm), o ζ-caroteno (380, 399 e 424 nm) e o licopeno (446, 469 e 505 nm) são ainda visíveis. O β-caroteno surge misturado com os novos compostos. Os picos destes novos compostos do fruto maduro são consistentes com a presença de: γ-caroteno (433, 469 e 494 nm), zeaxantina (436, 461 nm), neurosporeno (402, 439, 465 nm), δ-caroteno (491 nm) e β-zeacaroteno (435, 461 nm). Remetendo para a via metabólica (figura 4, p.14), os espectros mostram que a partir do neurosporeno a via metabólica seguida é a do β-caroteno.

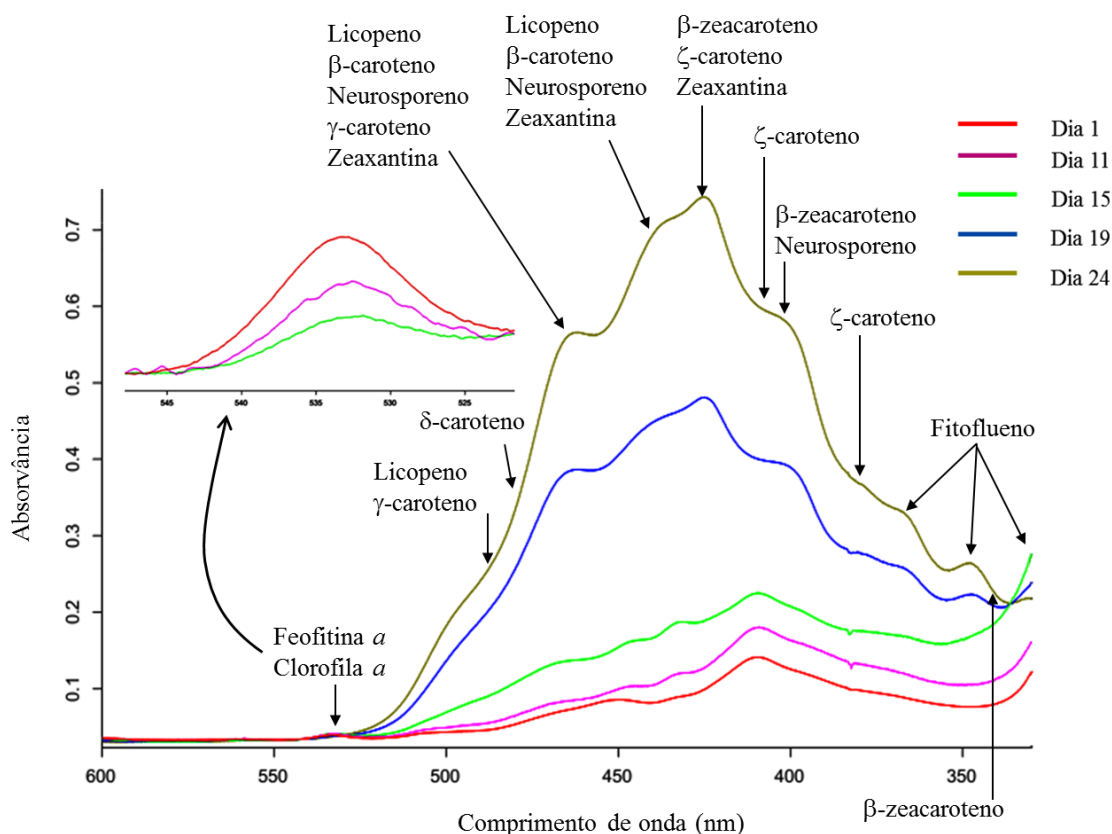


Figura 20 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm do cultivar Adina ao longo da maturação. Pormenor da redução do pico da feofitina e clorofila.

3.3.2 Cultivar Adara

O perfil deste cultivar é muito semelhante ao tomate Adina, registando-se assim nos mesmos carotenos e clorofilas: fitoflueno; feofitina *a*, clorofila *a*. Aparenta ainda apresentar o licopeno, o β -caroteno (430, 448, 465 nm), o ζ -caroteno (380, 430, 399 nm) e não aparenta possuir clorofila *b* (430, 449 nm). Também nas amostras de Adara o perfil é semelhante até ao dia 15, estando as concentrações de fitoflueno e de clorofila possivelmente a aumentar. Ao dia 24 o Adara apresenta um perfil idêntico ao perfil do Adina, apenas aumentando de intensidade do ζ -caroteno e diminuindo a do licopeno.

No tomate maduro, os principais carotenos que dão a coloração laranja forte às cultivares Adina e Adara são vários, que se podem identificar a partir dos espectros deconvoluídos do dia 24 (figura 19): neurosporeno, zeaxantina, e γ -caroteno e o licopeno.

3.3.3 Cultivares Amonet, Shir, Zebra e Zmira

O perfil destes cultivares em conjunto com o Adina e o Adara é muito semelhante, registando-se assim os mesmos carotenos e clorofilas no primeiro dia fitofluoreno ζ -caroteno, feofitina *a*, clorofila *a*, clorofila *b*, licopeno e β -caroteno (figura 21). A figura 22 apresenta os espectros dos 4 cultivares e dos padrões de licopeno e β -caroteno, onde se verificam pequenas diferenças na intensidade dos picos de licopeno (mais baixo nos Amonet e Shir e mais alto nos Zebra e Zmira). No que diz respeito ao β -caroteno o pico a 450 nm é mais alto no Shir e mais baixo no Amonet.

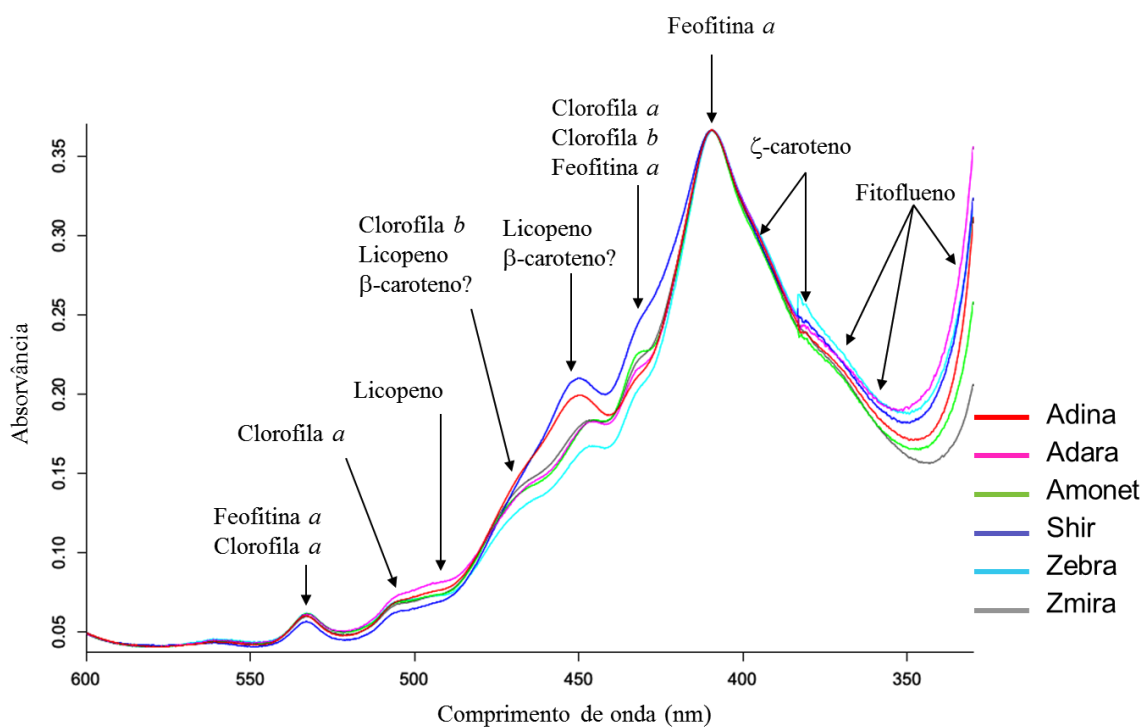


Figura 21 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm dos espectros normalizados de todos os cultivares no primeiro dia.

Aos 24 dias verifica-se que os espectros destes quatro cultivares estão completamente dominados pelo espectro de licopeno, podendo-se identificar também o β -caroteno. É de destacar a presença do pico da feofitina a 410 nm o qual sobressai nos cultivares Shir, Zebra e Zmira. Isto é consistente com a presença de riscas verdes na película e na polpa (rodeando as sementes) o que origina a cor escura destes tomates (ver figura 23).

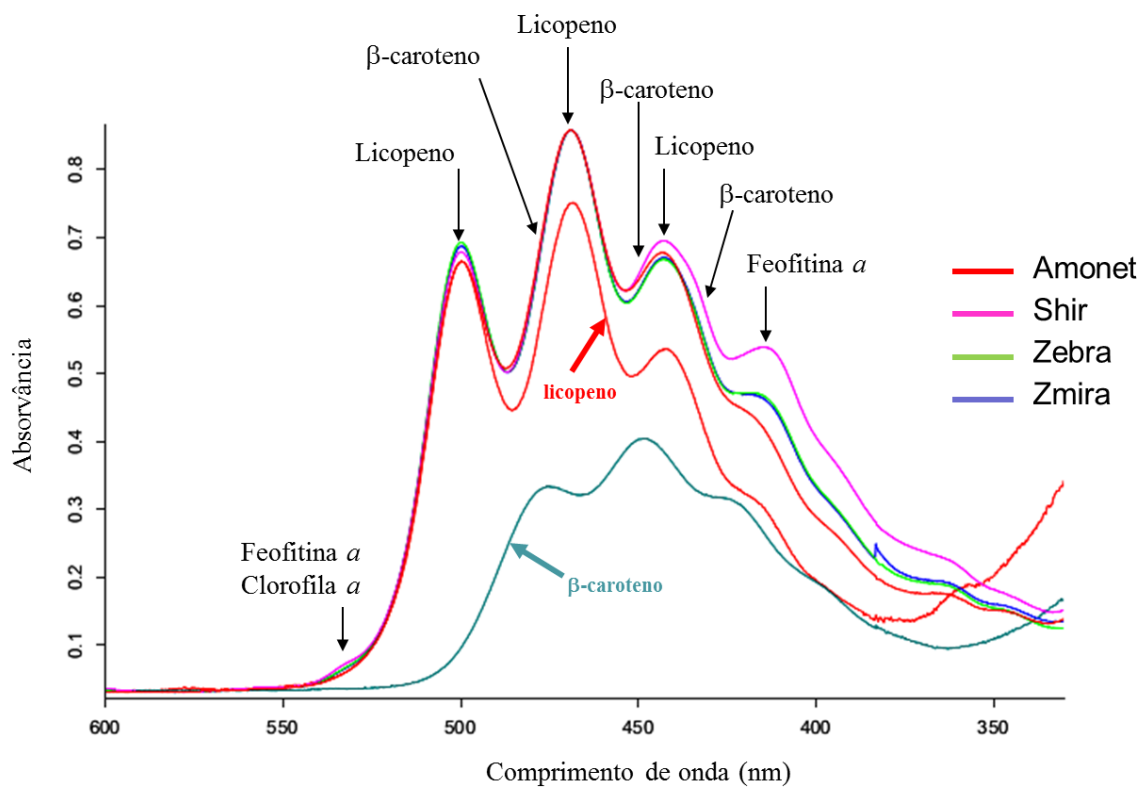


Figura 22 - Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm dos cultivares maduros e normalizados dos cultivares Amonet, Shir, Zebra e Zmira. Abaixo dos espectros das amostras encontram-se os espectros dos padrões licopeno e β -caroteno.

Na figura 22 também se pode apreciar que o cultivar Amonet, cuja cor é vermelha, apresenta menor incidência dos picos de feofitina e de clorofilas.

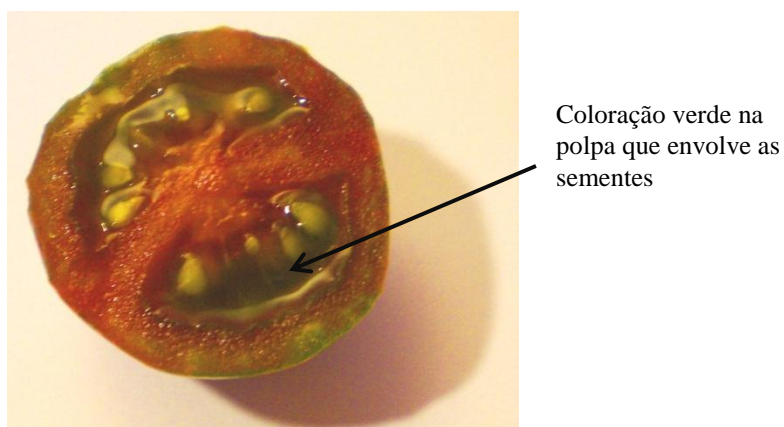


Figura 23 - Representação de um corte transversal do tomate Zmira, com destaque para a coloração verde devido à presença de clorofilas.

3.3.4 Cultivar vulgar

O cultivar vulgar foi apenas estudado no seu estado maduro, com o objetivo de poder comparar o tomate em estudo com um vulgar (ver figura 24). À semelhança dos cultivar Adina, Adara e Amonet maduras, este tomate também possui fitoflueno (330, 347 e 367 nm). Para além disso possui um espectro típico do licopeno (444, 469, 500 nm) e apresenta ligeiros traços de clorofila *b* (430, 454 e 594 nm) e ζ -caroteno (397, 420 nm). É ainda possível que possua β -caroteno, mas como nos casos anteriormente descritos, o perfil do espectro não permite a visualização direta dos picos deste caroteno.

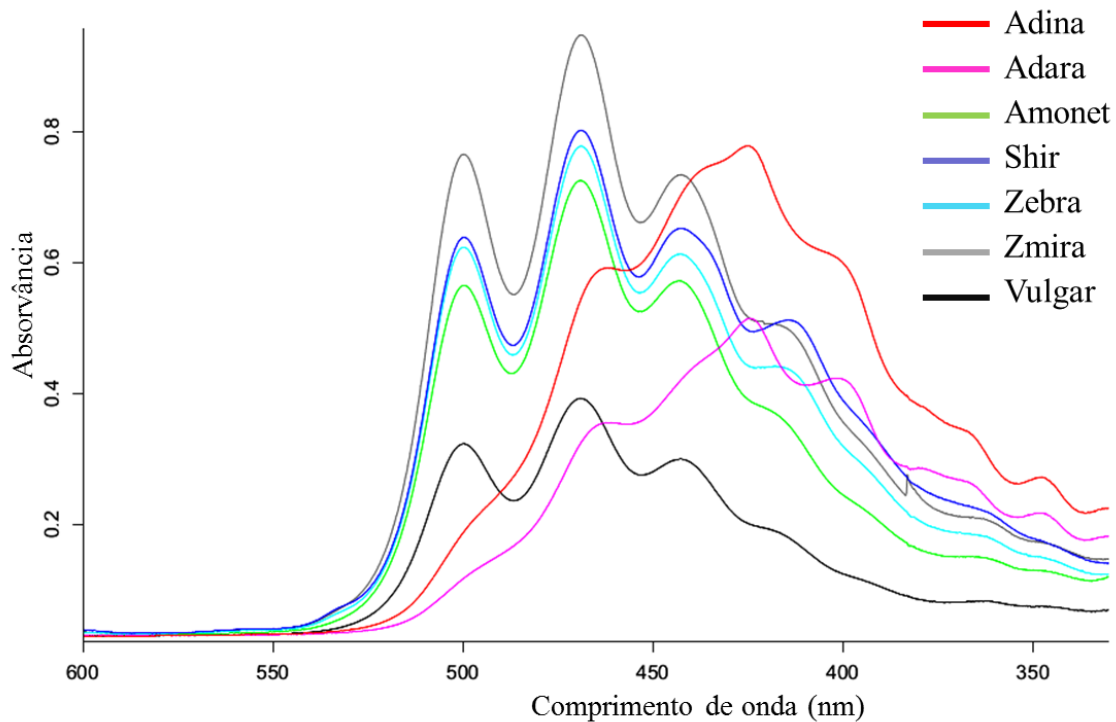


Figura 24- Espectro de UV/Vis de 600 a 330 nm dos cultivares maduros no estado maduro (dia 24).

3.4. Quantificação de carotenos

No que diz respeito à determinação da concentração de carotenos nas amostras, no princípio seguiu-se a metodologia de uso corrente para matrizes de tomate, onde usualmente se quantificam apenas o licopeno e o β -caroteno, no pressuposto que estes são os componentes maioritários. Para isso, construiu-se uma curva de calibração para cada caroteno a partir da absorvância dos picos a 470 nm (licopeno) e a 450 nm (β -caroteno). Uma vez determinadas as concentrações destes carotenos nos diferentes estados de maturação de cada cultivar, verificou-se que os valores se apresentavam incoerentes com o perfil dos espectros das amostras, bem como com a coloração dos frutos. Perante esta situação, efetuou-se uma análise detalhada dos espectros das amostras e dos padrões, a fim de encontrar uma estratégia para a quantificação dos carotenos. Observando o perfil dos espectros dos dois padrões, verificou-se que no comprimento de onda 520 o β -caroteno praticamente não absorve radiação, ao contrário do licopeno. Assim sendo, estabeleceu-se este comprimento de onda para a quantificação de licopeno nas amostras e construiu-se uma nova curva de calibração. Por sua vez, o β -caroteno não apresenta um máximo característico onde seja único a absorver. Por esse motivo, optou-se por recorrer a uma equação já anteriormente testada no cálculo da concentração de carotenos, e em particular, em carotenos de tomate laranja e vermelho (Georgé et al., 2011). Esta equação relaciona a proporção entre o pico a 450 nm do β -caroteno e o pico a 503 nm do licopeno, subtraindo o segundo ao primeiro de forma equilibrada.

Com as duas alternativas encontradas, foi assim possível estimar a concentração de licopeno e β -caroteno nas amostras. Os resultados revelaram valores mais elevados de licopeno para os cultivar de cor vermelha mais intensa, apresentando-se os valores de ambos os carotenos mais elevados nos frutos maduros. No entanto, nos cultivar de tonalidade laranja (Adina e Adara) esperavam-se valores de β -caroteno superiores, quando na realidade se revelaram idênticos e até inferiores a outros cultivar (ver tabela A.III.1 em anexo). Nos gráficos da figura 25 pode verificar-se que os carotenos se desenvolveram a par da maturação dos frutos, atingindo o seu máximo nos frutos mais maduros de cada cultivar.

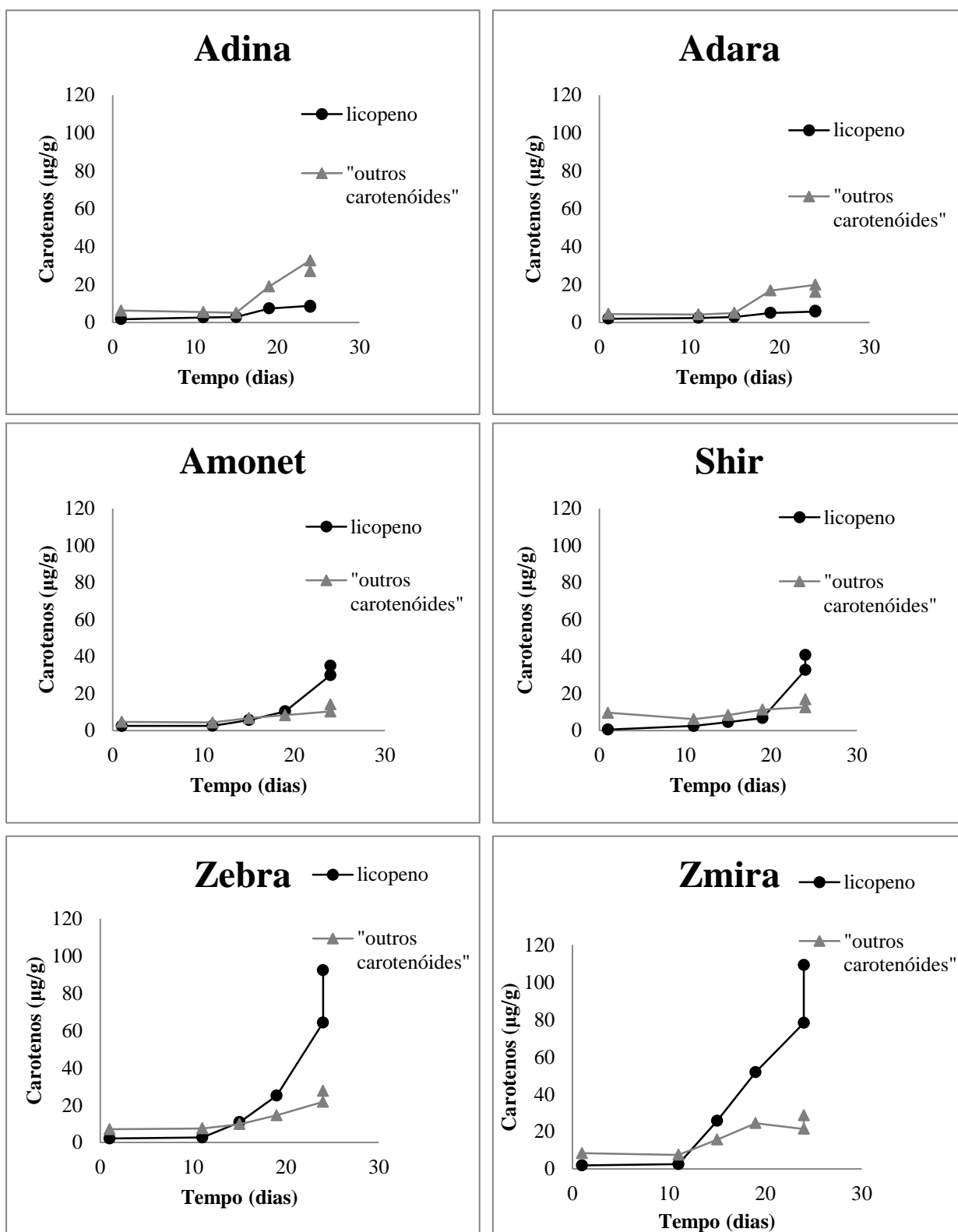


Figura 25 - Representação gráfica da evolução da concentração de licopeno e “outros carotenos” ao longo dos dias de maturação para os diferentes tipos de tomate: a) tomate Adina; b) tomate Adara; c) tomate Amonet; d) tomate Shir, e) tomate Zebra e f) tomate Zmira. Valores ao dia 24 correspondem à concentração antes e após processamento por AP.

Pela quantificação do licopeno, o Adina possui 8,82 $\mu\text{g/g}$ e o Adara 5,82 $\mu\text{g/g}$. Quanto ao valor para o β -caroteno, o perfil do espectro apresenta mais claramente a presença de outros carotenos. Desta forma, mesmo sem poder quantificar isoladamente os diversos compostos (entre eles o β -caroteno), pode-se utilizar este valor como um indicativo dos carotenos que não são licopeno. Deste modo, a quantificação dos que não são licopeno (β -caroteno incluído) foi feita simplesmente pela aplicação da equação. No entanto, não seria correto afirmar que os valores obtidos correspondem a uma soma do β -caroteno, neurosporeno, zeaxantina, e γ -caroteno, pois os coeficientes de extinção são diferentes de composto para composto, e de acordo com a Lei de Lambert-Beer, a relação da absorvância com a concentração seria diferente. Os valores atribuídos ao licopeno e ao β -caroteno são na realidade indicativos do teor de licopeno e outros carotenos. Num estudo levado a cabo por Georgé *et al.* (2011), os autores referem que o tomate amarelo não possui licopeno e que o β -caroteno é o caroteno em maior quantidade, embora, referem os autores, chegue a ser quatro vezes inferior ao β -caroteno dos cultivares vermelhos (Georgé *et al.* 2011). Em contradição, Pinela *et al.* (2011) afirmam que o licopeno foi identificado em maior quantidade que o β -caroteno no tomate amarelo. O caso do Adina e do Adara tem semelhanças com o segundo estudo, uma vez que estes cultivares apresentam licopeno e o β -caroteno não se encontra claramente visível nos espectros UV/Vis.

No que diz respeito às cultivares Shir, Zebra e Zmira, o licopeno possui um espectro claramente dominante na fase madura, o que se expressa no cálculo da quantificação deste caroteno (32,73 $\mu\text{g/g}$, 64,28 $\mu\text{g/g}$ e 78,22 $\mu\text{g/g}$, respetivamente). Já o β -caroteno não se evidencia com clareza no espectro, pelo que não é possível considerar os valores da quantificação. No entanto o perfil da evolução deste caroteno representado na figura 25 faz algum sentido, uma vez que nos espectros destes três variedades parecem estar presente (mas pouco definido) e também evolui muito menos que o licopeno.

A presença de clorofilas é também coerente com o aspeto físico destes cultivares, uma vez que possuem riscas (na pele) e polpa verdes (junto às sementes).

O tomate Amonet e o vulgar maduros apresentam uma coloração semelhante e os seus gráficos também refletem com evidência o perfil do licopeno. No entanto, os espectros encontram-se abaixo dos dos cultivares Shir, Zebra e Zmira. Esta informação obtida pelo espectro vai ao encontro da quantificação, que traduz valores de licopeno mais baixos: 29,98 $\mu\text{g/g}$ para o Amonet e 16,552 $\mu\text{g/g}$ para o vulgar. No que diz respeito ao β -

caroteno, os valores não podem ser considerados pelo mesmo motivo apresentado para os cultivares Shir, Zebra e Zmira.

Alguns estudos realizados em tomate referem ainda outros carotenos que não os atribuídos ao tomate em estudo: luteína, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrolipoceno, licopeno 5,6-diol e licopeno 1,2-epoxido. Segundo Dumas *et al.* (2003), todas as diferenças observadas no teor de carotenos entre cultivares diferentes de tomate estão associadas ao genótipo de cada um. No entanto, existe uma série de outros fatores como o estado de maturação, as práticas agrícolas (disponibilidade de água, minerais e nutrientes) e o clima (especialmente luminosidade e temperatura) que são determinantes para a biossíntese desses compostos.

No entanto, a grande maioria dos estudos quantifica essencialmente o licopeno e o β -caroteno. Os valores apresentados são muito variáveis, podendo o licopeno ir de 1,1 a 122 $\mu\text{g/g}$ e o β -carotenos de 0,8 até 10 $\mu\text{g/g}$. Já para cultivares enriquecidos em licopenos os valores deste caroteno variam entre 175 e 253 $\mu\text{g/g}$ (tabela A.III.1 em anexo). O tomate em estudo apresenta os valores mais altos de licopeno para os cultivares Zebra e Zmira, com respetivamente 64,28 $\mu\text{g/g}$ e 78, 22 $\mu\text{g/g}$. Estes valores não são tão altos como os cultivares enriquecidas em licopeno, no entanto, são superiores ao tomate vulgar. Por outro lado, embora todos os cultivares já se encontrassem num estado de maturação apropriado para o seu consumo, era ainda possível atingirem um estado mais avançado de maturação. Outro facto relevante prende-se com o método de extração. Embora o método seja vastamente utilizado e se tenha otimizado, poderia ainda ser melhorado.

3.4.1 Quantificação do licopeno após processamento por AP

A extração dos carotenos foi ainda mais eficaz após o processamento do tomate por alta pressão (500 MPa, 5 minutos), chegando a extrair-se do Zmira 109,3 $\mu\text{g/g}$ e do Zebra 92,3 $\mu\text{g/g}$. O cultivar onde se verificou maior percentagem de extração pela alta pressão foi o Zebra (43,59%), seguida do Zmira (39,74%), do Shir (24,84%), do Amonet (17,13%), e por último do Adara (5,36%). O cultivar Adina foi o único a registar um comportamento diferente, sofrendo um decréscimo da extração de licopeno após processamento por alta pressão (AP), na ordem dos 5,53% (ver tabela 4).

Tabela 4 – Concentrações de β -caroteno e licopeno nos cinco tipos de tomate em estudo ao fim de 24 dias de maturação. Variação da extração dos carotenos consoante a metodologia: extração simples (ES) e extração após processamento por alta pressão (500 MPa, 5 minutos) (EAP).

Amostra	Licopeno ($\mu\text{g/g}$)	Taxa de compressão (MPa/segundo)
Adina ES	8,821 \pm 0,30	6,3
Adina EAP	8,333 \pm 0,13	
Variação (%)	-5,532	
Adara ES	5,824 \pm 0,25	6,7
Adara EAP	6,136 \pm 0,20	
Variação (%)	5,359	
Amonet ES	29,975 \pm 2,82	6,1
Amonet EAP	35,108 \pm 1,19	
Variação (%)	17,125	
Shir ES	32,728 \pm 1,47	6,6
Shir EAP	40,858 \pm 1,10	
Variação (%)	24,839	
Zebra ES	64,281 \pm 7,74	6,4
Zebra EAP	92,301 \pm 4,98	
Variação (%)	43,590	
Zmira ES	78,217 \pm 16,09	6,3
Zmira EAP	109,300 \pm 9,12	
Variação (%)	39,739	

Nota: os dados representam os valores médios \pm o desvio padrão (n= 4).

A maioria dos estudos consultados sobre a aplicação da AP em matrizes de tomate apresentam pressões superiores a 300 MPa e inferiores a 600 MPa, sem temperatura, como sendo as mais eficazes no aumento da extração dos carotenos totais. Hsu *et al.* (2008) registaram um aumento de 62 % nos carotenos totais e de 56 % para o licopeno. As melhores condições referidas pela bibliografia consultada são: 500 MPa, sem aplicação de temperatura e com a duração de 1 a 15 minutos. Foi com base nestes dados que se realizou o processamento de AP nas amostras a 500 MPa, durante 5 minutos e sem aplicação de temperatura. Os fenómenos de melhoria da extração dos carotenos por aplicação de AP poderão ser justificados pelo facto de a alta pressão causar uma rutura nos tecidos do tomate, com consequente quebra das paredes celulares, o que enfraquece as ligações entre o licopeno e a matriz do tomate, libertando-se assim mais licopeno (Qiu *et al.*, 2006). Desta forma, o fenómeno de maior extratabilidade pelo recurso à alta pressão, aparentemente,

reside no efeito desta sobre as membranas das células vegetais (Shi e Le Maguer, 2000). Para além disso, a alta pressão afeta as estruturas das proteínas e dos polímeros de hidratos de carbono, e uma vez que os carotenóides se encontram fortemente ligados a macromoléculas como proteínas e lípidos membranares, é facilmente interpretada a melhor extração dos carotenos (Gartner et al., 1997).

A menor extratibilidade dos carotenos no cultivar Adara pode ser atribuída à lise celular e dos seus organelos, libertando as enzimas dos vacúolos e de outras estruturas celulares. Uma vez que os vacúolos ocupam a maior parte da célula vegetal e por estes conterem várias enzimas é possível que a resposta ao impacto da alta pressão nos vacúolos seja a oxidação dos carotenos (McInerney *et al.*, 2007). Para além disso, Barba *et al.* (2011) cita que entre 400 e 600 MPa pode ocorrer uma indução da ativação de enzimas pela pressão. Foi já reportado que a AP afeta as ligações hidrofóbicas e electrostáticas das proteínas, afetando as suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. Assim sendo, estas alterações conformacionais podem fortalecer a atividade enzimática, expondo as suas posições ativas e, conseqüentemente, facilitando a conversão catalítica. A redução do volume que ocorre na pressurização poderá ser outro fator de impacto na oxidação, pois segundo o Princípio de Le Chatelier, este fenómeno facilita a ocorrência de reações de oxidação.

Embora as reações que ocorrem durante a oxidação dos carotenos por alta pressão ainda não estejam bem clarificadas, Suárez-Jacobo *et al.* (2011) subescreve que podem iniciar-se com epoxidação e a formação de apocarotenóides, como resultado do ataque às ligações duplas terminais, formando-se compostos de pequena massa molecular, similares aos obtidos na oxidação de lípidos. Georgé *et al.* (s.d.) mencionou um decréscimo de β -caroteno, compostos fenólicos e vitamina C em cultivares de tomate amarelo. Em uvas e mirtilos foi hipoteticamente atribuída a oxidação de ácido ascórbico e de antioxidantes pela ativação da polifenoloxidase pela AP (Butz e Tauscher, 2002).

Se se analisar a atividade antioxidante hidrofílica das amostras em estudo (abordada mais à frente no ponto 3.6), verifica-se que os cultivares Zebra e Zmira aumentaram a atividade antioxidante com a AP e são também os cultivar que mais beneficiaram com a AP na extração de carotenos. Em contrapartida, o Adina, o Adara, o Amonet e o Shir sofreram um decréscimo da atividade antioxidante, correspondendo também às amostras que no processo de extração menos aumentaram a extratibilidade dos carotenos. Daqui

depreende-se que a composição da matriz do tomate terá um papel importante na proteção da oxidação dos carotenos: o teor de antioxidantes hidrofílicos e o teor de enzimas. Possivelmente o cultivar Adara possui uma relação de enzimas e antioxidantes desfavoráveis, tornando os carotenos vulneráveis à AP.

3.5. Análise da bioacessibilidade

A bioacessibilidade simula a fase inicial do processo digestivo. Assim, a simulação deste processo *in vitro* consiste na adição faseada das enzimas α -amilase, pepsina e pancreatina com sais biliares. Ao longo do processo são efetuados ajustes de pH e a temperatura mantém-se a 37 °C, simulando o que ocorre entre a boca e o estômago. Deste modo, testa-se a capacidade das enzimas digestivas extraírem os carotenos da matriz alimentar e, ao mesmo tempo, a resistência dos carotenos ao processo digestivo.

Uma análise dos dados referentes à bioacessibilidade, antes e após processamento por alta pressão, permite verificar que os carotenos se tornaram menos biodisponíveis após este processamento (ver tabela 5). Segundo a literatura consultada, este decréscimo de bioacessibilidade (libertação da matriz e incorporado nas micelas) deve-se, possivelmente, às alterações provocadas na microestrutura da polpa de tomate. Estas modificações consistem num aumento das ligações entre as fibras na polpa de tomate induzidas pelo processamento por alta pressão, o que provoca a retenção do licopeno, diminuindo, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Esta alteração da macroestrutura molecular dificulta a acessibilidade das enzimas digestivas e dos sais biliares para digerir os carotenóides (McClements *et al.*, 2009).

Um estudo desenvolvido por Svelander (2011) revelou que a aplicação do processamento por alta pressão (100 MPa, 40 minutos a 90 °C) em emulsões de cenoura e em emulsões de tomate causava uma rutura nas células da cenoura aumentando a bioacessibilidade do α - e β -caroteno. No entanto, o mesmo não se verificou para o licopeno no tomate. Para além da rede pécica impedir a absorção do β -caroteno e do licopeno no tomate, as fibras podem ainda diminuir a biodisponibilidade dos carotenóides através de um mecanismo de aumento da viscosidade do trato gastro intestinal, o que reduz a migração dos carotenóides e dificulta a formação de micelas, através da ligação ácidos biliares e dos fosfolípidos (Svelander, 2011).

Tabela 5 –Bioaccessibilidade do licopeno antes e após processamento por AP (500 MPa, 5 minutos) nos seis tipos de tomate maduros.

Amostra	Estudo	Licopeno (%)
Adina	Carotenos bioacessíveis	8.611
	Variação com a AP	-8.720
Adara	Carotenos bioacessíveis	9.616
	Variação com a AP	-4.664
Amonet	Carotenos bioacessíveis	4.168
	Variação com a AP	-13.462
Shir	Carotenos bioacessíveis	6.084
	Variação com a AP	-76.878
Zebra	Carotenos bioacessíveis	6.209
	Variação com a AP	-82.687
Zmira	Carotenos bioacessíveis	6.712
	Variação com a AP	-47.431

Os cultivares que sofreram maior retenção de licopeno foram o Zebra (82,69 %) e o Shir (76,88 %), tendo sido o Adina (8,72 %) e o Adara (4,66 %) aqueles que maior percentagem de carotenos libertaram, comparativamente à bioaccessibilidade sem AP. Comparando com os resultados da extração, facilmente se constata que o tomate que melhorou a sua extratabilidade na extração após AP corresponde ao que revelou menor bioaccessibilidade após processamento por AP. Possivelmente, o aumento das ligações às fibras da polpa de tomate forma uma emulsão de rede pécica e impede o acesso das enzimas e dos ácidos biliares, impedindo também o acesso das enzimas do próprio tomate aos carotenos, limitando assim a sua oxidação. A diferença entre a extração e a bioaccessibilidade é que no primeiro caso a acetona consegue quebrar estas ligações.

3.6 Atividade antioxidante pelo radical livre DPPH

O tratamento das amostras efetuado com metanol 70 % revelou um extrato praticamente incolor, com um resíduo de cor intensa. A falta de coloração no extrato corresponde assim a uma ausência, ou quase inexistência, de carotenos no extrato, o que provavelmente estará relacionado com o facto do solvente conter 30 % de água. Deste

modo, a atividade antioxidante medida pelo radical livre DPPH corresponde à atividade antioxidante dos antioxidantes hidrofílicos totais.

O tomate Amonet apresentou a maior atividade antioxidante, com um EC_{50} de 476,96 mg/ml, seguido do Shir com EC_{50} igual a 610,17 mg/ml. O cultivar com menor atividade antioxidante hidrofílica foi o Zebra com EC_{50} de 802,694 mg/ml, seguido do Zmira, Adara e Adina, com valores de EC_{50} próximos, respectivamente, 737,62 mg/ml, 722,92 mg/ml e 709,30 mg/ml (resultados em detalhe em anexo na tabela A.III.2).

Apesar do bom coeficiente de determinação da linearidade obtida pela concentração do DPPH em função da concentração das amostras, as amostras não chegaram a reduzir o radical DPPH a 50 %. As amostras deveriam assim, estar menos diluídas. Como se pode verificar nos gráficos da figura 26, o processamento por alta pressão provocou um decréscimo da atividade antioxidante hidrofílica nos cultivares Adina, Adara, Amonet e Shir. Por sua vez, esta aumentou nos cultivares Zebra e Zmira. No entanto, as alterações nos cultivares Adina e Zebra foram baixas, sendo um decréscimo 7,51% na primeira e um aumento de apenas 5,59% na segunda. Já os outros cultivares variaram em mais de 20%, chegando mesmo o cultivar Shir a variar 41,19%. Segundo estudos já efetuados em tomate, após processamentos de 200-500 MPa/25 °C/2,5-5 minutos a atividade antioxidante hidrofílica não é afetada, ou apenas afetada de forma insignificante (Hsu, 2008 e Sánchez-Moreno *et al.*, 2003). No entanto, Sánchez-Moreno *et al.* (2006a) submeteram puré de tomate a 400 MPa/25 °C/15 minutos verificaram uma perda de vitamina C, com conseqüente perda da atividade antioxidante hidrofílica. As diferenças entre os resultados estão possivelmente relacionadas com a composição da matriz de cada cultivar de tomate, que podem ou não proteger os compostos antioxidantes do tomate (Hsu, 2008).

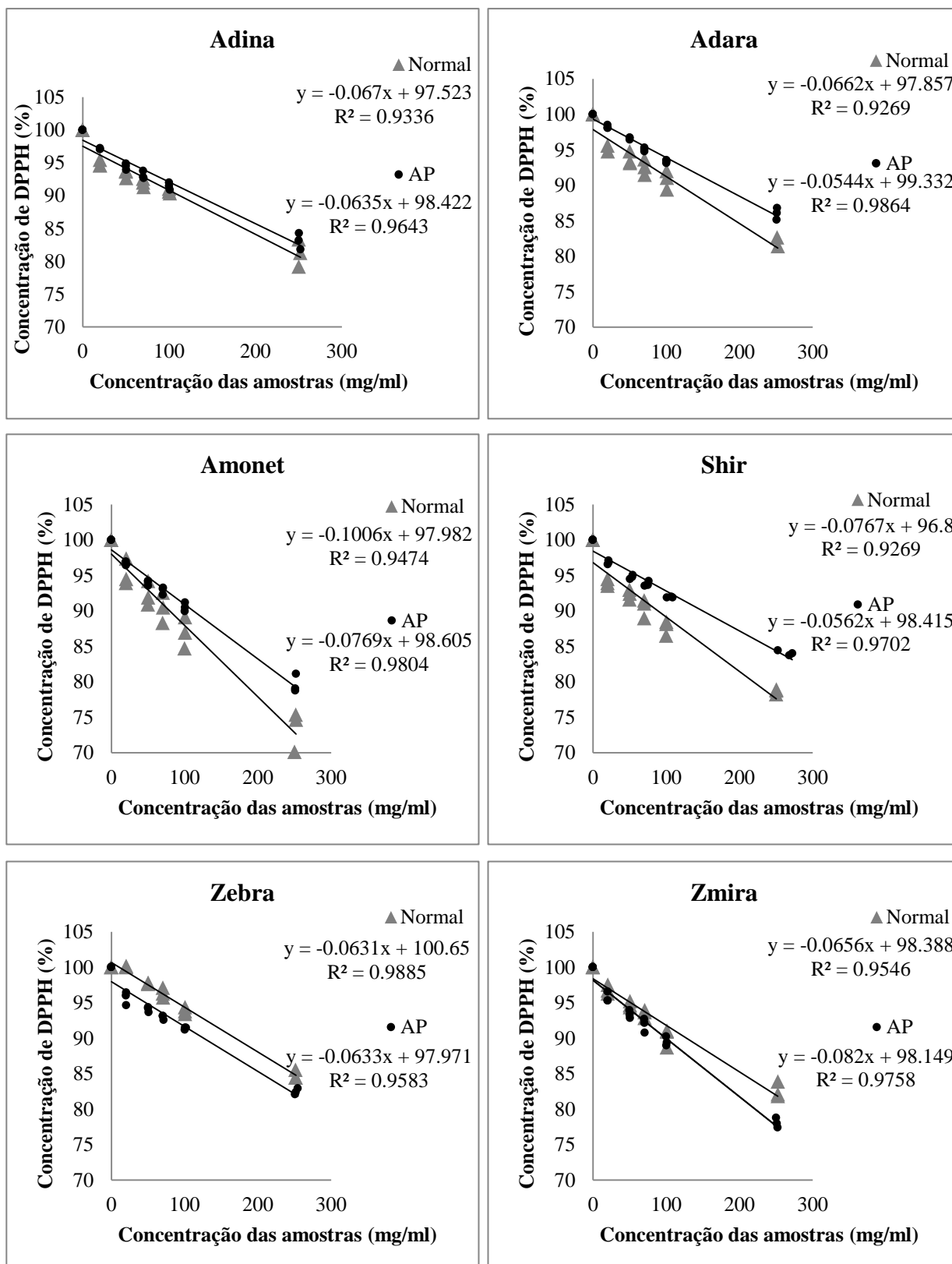


Figura 26 – Atividade antioxidante hidrofílica dos diferentes cultivares de tomate em estudo. Resultados expressos em % de DPPH em função da concentração da amostra. AP representa as amostras que foram processadas por alta pressão.

3.7. Determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico

Recorreu-se ao método fenol-sulfúrico para determinar a presença, ou não, de sacarose no tomate. O ensaio foi desenvolvido com o tomate maduro do ano anterior (previamente triturado e congelado), de modo a perceber que tipo de açúcares se iriam estudar ao longo da maturação dos frutos. Prepararam-se padrões apenas com glucose e frutose (1:1), e efetuou-se o método fenol-sulfúrico e DNS em paralelo para os cultivares de tomate Adara, Amonet e Zebra. Os resultados entre os dois métodos apresentaram concentrações de açúcar semelhantes para cada tomate (resultados na tabela A.III.3 em anexo). Se o tomate possuísse sacarose na sua constituição, o método fenol-sulfúrico iria apresentar concentrações de açúcar superiores às apresentadas pelo método DNS.

Com este ensaio preliminar, decidiu-se quantificar o teor de frutose e glucose (açúcares redutores) ao longo dos diferentes estados de maturação do tomate.

3.8 Quantificação de glucose e frutose no tomate

Para o estudo da evolução de frutose e glucose no tomate ao longo de diferentes estados de maturação desenvolveu-se um método de previsão com recurso à técnica de espectroscopia de infravermelho. Simultaneamente, a quantificação dos açúcares redutores foi também efetuada pelo método DNS, de modo a confirmar os resultados da previsão por IV (ver em anexo tabela A.III.4). As curvas de calibração do método IV-PLS para os dois açúcares apresentam um bom coeficiente de relação linear, como se pode visualizar na figura 27 (ver a figura A.III.1 e A.III.2 em anexo com os coeficiente b da glucose e da frutose, obtidos pelo PLS).

De um modo geral, os dois métodos apresentaram valores muito aproximados, registando-se perfis de evolução dos teores de açúcar apenas com algumas diferenças (figura 28). Para cada cultivar de tomate, o teor máximo de açúcares redutores foi atingido no último dia de colheita (dia 24), com duas exceções: o tomate Shir sofreu um ligeiro decréscimo (aproximadamente 7,21 % pelo método DNS e 14,32% pelo método IV-PLS) e, segundo o método IR-PLS o tomate Zmira sofreu um decréscimo de aproximadamente 8,17 %, enquanto o método DNS revelou um aumento na ordem dos 22,40 %.

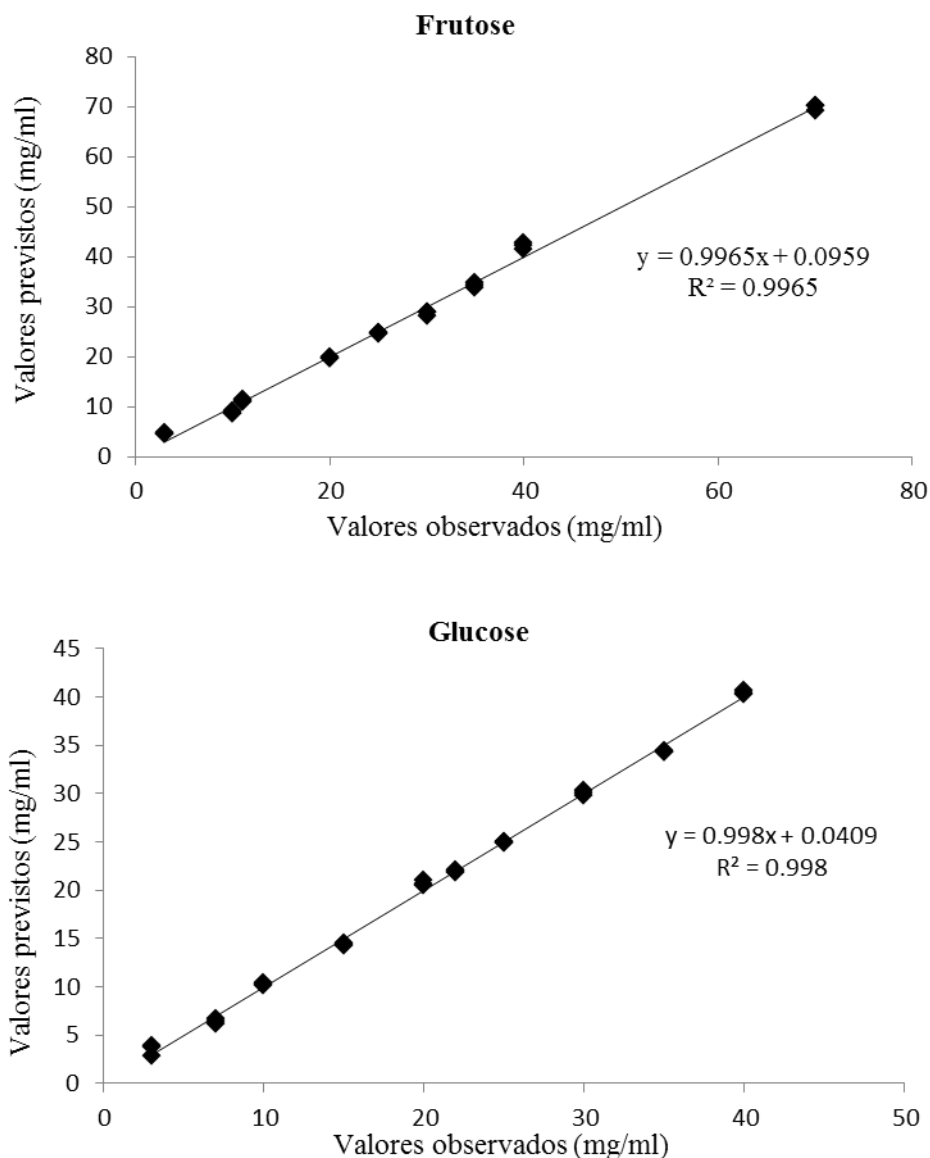


Figura 27 – Curvas de calibração obtidas para a frutose e para a glucose pelo método IV-PLS (temperatura da sala $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, HR $40\% \pm 5$).

Relativamente à evolução geral, entre o dia 11 e o dia 15, os cultivares de tomate Adina e Adara sofreram ambos um decréscimo no teor de açúcares. O tomate Zebra sofreu um decréscimo entre os dias 1 e 11 e o Shir entre os dias 19 e 24. Estas variações foram registadas pelos dois métodos de quantificação de açúcares, mas o método IV-PLS registou ainda mais três decréscimos dos teores de açúcar ao longo da maturação do fruto: o Amonet entre os dias 15 e 19; o Shir entre os dias 1 e 11 e o Zmira entre os dias 19 e 24.

Segundo BeMiller (2010), dois dos fatores ambientais com maior influência na acumulação de açúcares no tomate são a radiação solar e a temperatura. Quando aplicadas

durante a divisão celular do fruto, temperaturas elevadas – de 26 a 30°C – levam a um aumento dos sólidos solúveis totais, e ao amadurecimento. Isto deve-se, respetivamente, a alterações na atividade enzimática da biossíntese de hidratos de carbono, e ao aumento da transpiração. Assim, um aumento da temperatura normalmente promove a evapotranspiração do fruto e induz um aumento nos níveis de açúcar. No entanto, com o aumento de competição na película os açúcares diminuem, provavelmente devido a respiração a elevadas temperaturas. Por este motivo, alterações sazonais com diferentes radiações causam um efeito profundo nos açúcares do fruto. De facto, durante a divisão celular (\approx segunda quinzena de abril) registou-se uma média máxima de 15 °C (ver figura A.III.3 em anexo), dando-se depois grandes oscilações durante o período de maturação (média máxima de 20°C com oscilações entre 32° C e 9° C). Deste modo, os decréscimos no teor de açúcares ao longo da maturação do fruto estão possivelmente relacionados com a situação climatérica atípica.

Podem ainda realçar-se o facto de os cultivares Shir e Zebra apresentarem os valores mais baixos de açúcares redutores (ver tabela A.III.4 em anexo). Segundo a bibliografia consultada, os valores de tomate vulgar variam entre 1,2 % e 7,7 % (Beckles, 2012), estando os valores obtidos compreendidos nesse intervalo. No que diz respeito ao perfil da evolução dos teores de frutose e glucose (figura 29), verifica-se uma heterogeneidade entre as diferentes cultivares ao longo da maturação. O Adina e o Adara possuem um perfil muito semelhante, embora no primeiro dia o Adina possua mais frutose (1,071 g/100 g) do que glucose (0,560 g/100 g) e o Adara possua uma relação de aproximadamente 1:1 (\approx 1 g/100 g). Ambos possuem mais frutose (\approx 3,108 g/100 g) do que glucose (\approx 2,8 g/100 g) no último dia (dia 24), atingindo também nesse dia o máximo dos dois açúcares. Os cultivares Shir e Zebra possuem sempre mais glucose do que frutose, embora no dia 24 o Shir sofra um decréscimo em ambos os açúcares (1,312 g/100 g de frutose e 1,635 g/100 g de glucose) e o Zebra mantenha aproximadamente os mesmos valores que no dia 19 (1,751 g/100 g de frutose e 2,110 g/100 g de glucose). O cultivar Amonet inicia a sua maturação com ligeiramente mais frutose (0,980 g/100 g) do que glucose (0,731 g/100 g), no entanto termina, no dia 24, com 3,013 g/100 g de glucose e com 2,049 g/100 g de frutose.

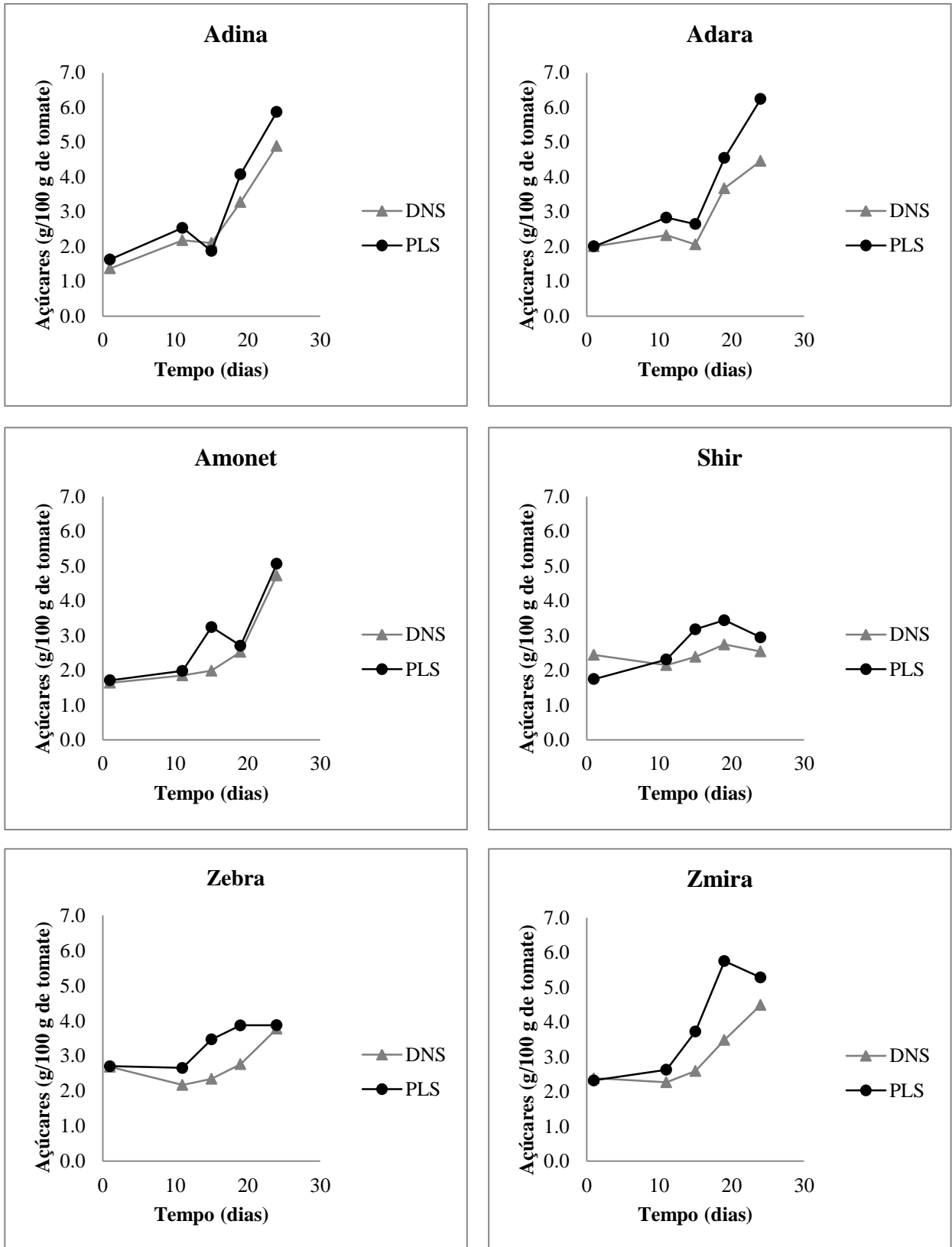


Figura 28 – Representação gráfica da evolução dos teores de açúcar no tomate em estudo ao longo do tempo (dias).

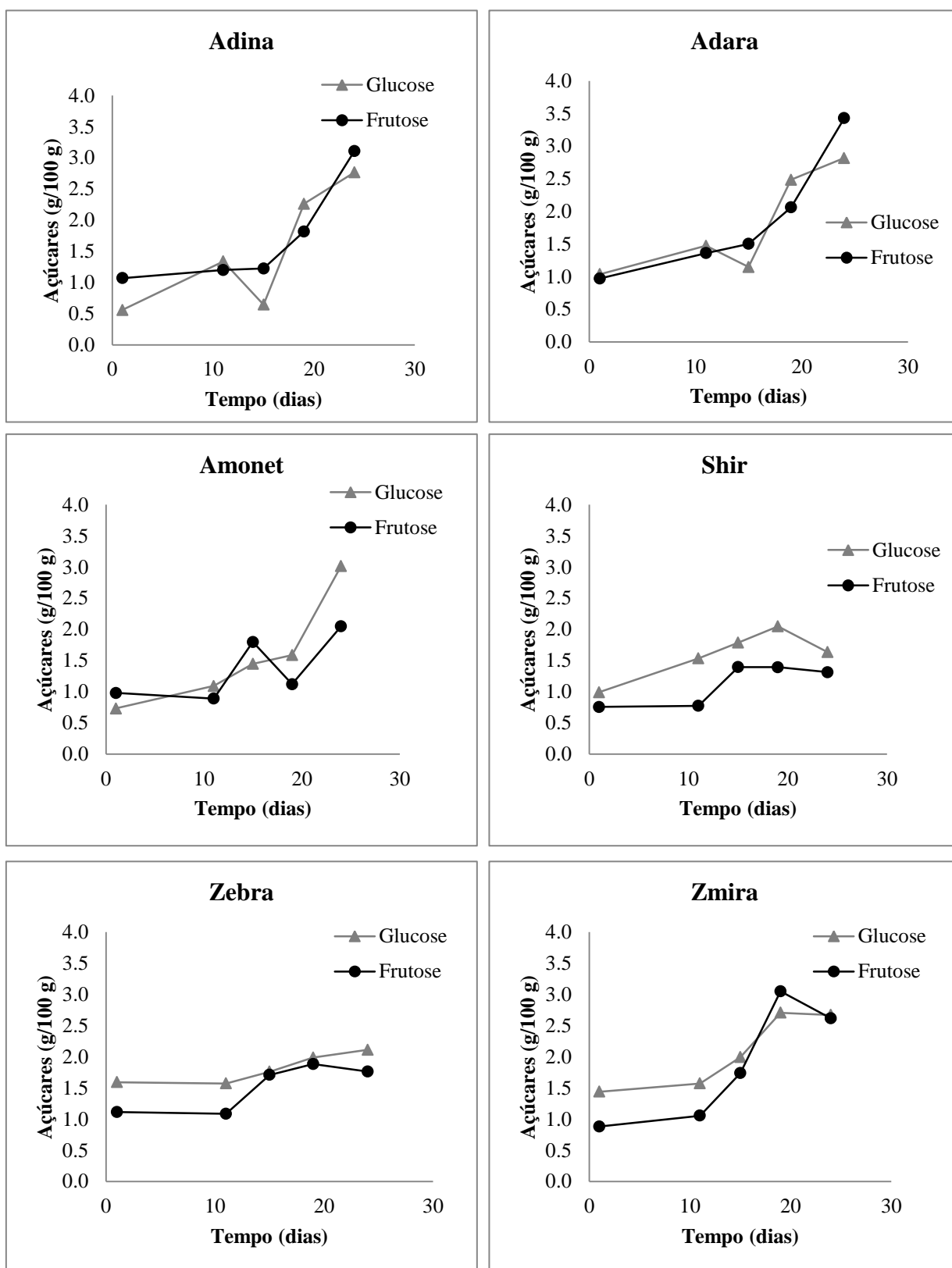


Figura 29 – Representação gráfica da evolução dos teores de glucose e frutose ao longo dos diferentes estados de maturação das cinco cultivares de tomate. Resultados obtidos por análise quimiométrica PLS dos espectros de IV do sumo de tomate.

O cultivar Zmira possui um perfil bastante diferente dos outros cultivares, uma vez que em verde possui mais glucose (1,439 g/100 g) do que frutose (0,880 g/100 g) e no dia 19 atinge o máximo para os dois açúcares (3,047 g/100 g de frutose e 2,706 g/100 g de glucose). No estado maduro (dia 24) a glucose mantém-se aproximadamente igual (2,669 g/100g), já a frutose sofre um decréscimo (2,614 g/100 g), sendo o segundo o principal responsável pelo decréscimo dos açúcares totais.

Segundo Pinela *et al.* (2011), o tomate laranja possui maior teor de açúcares que o tomate vermelho, com 3,242 % de frutose e 3,18 % de glucose. Estes dados são muito semelhantes aos resultados do IV-PLS: Adara e Adina com uma relação aproximada de 1:1, frutose:glucose e ambas com o teor máximo de açúcares comparativamente com as restantes cultivares, de aproximadamente 6 %.

3.9. Determinação do extrato seco

Como se pode verificar na tabela 6, os teores de água não variam muito entre os cultivares de tomate em estudo. Apenas se verifica que o cultivar vulgar apresenta um teor de água superior comparativamente com os cultivares em estudo. Pineta *et al.* (2011), obteve uma percentagem de água para o tomate amarelo de 90,6 %, e para os cultivares de tomate vermelho obteve entre 92 e 93% de teor de água.

Tabela 6 – Teores de água (%) ao longo da maturação das cinco cultivares em estudo e teor de humidade de um cultivar de tomate maduro vulgar.

Tomate	Dias	Teor de água (%)	Tomate	Dias	Teor de água (%)
Adina	1	93,242 ± 0,11	Shir	1	92,419 ± 0,73
	11	93,901 ± 0,18		11	93,783 ± 0,09
	15	93,557 ± 0,13		15	93,949 ± 0,08
	19	92,906 ± 0,09		19	92,423 ± 0,077
	24	91,219 ± 0,17		24	93,555 ± 0,03
Adara	1	93,247 ± 0,50	Zebra	1	92,572 ± 0,13
	11	92,915 ± 0,54		11	93,020 ± 0,07
	15	92,928 ± 0,25		15	92,863 ± 0,21
	19	92,476 ± 0,11		19	92,469 ± 0,08
	24	92,139 ± 0,15		24	92,714 ± 0,13
Amonet	1	93,195 ± 0,37	Zmira	1	92,329 ± 0,09
	11	93,717 ± 0,27		11	92,699 ± 0,14
	15	93,060 ± 0,03		15	92,296 ± 0,07
	19	93,435 ± 0,18		19	91,433 ± 0,07
	24	92,173 ± 0,35		24	91,560 ± 0,11
Vulgar	-	95,144 ± 0,19			

Nota: os dados representam os valores médios ± o desvio padrão (n= 6).

Poderão ainda atribuir-se as pequenas oscilações de teor de água dentro do mesmo cultivar, ao longo da maturação, às questões climáticas atípicas.

4. Conclusões

O PCA revelou uma boa discriminação dos diferentes cultivares maduros, refletindo com clareza as características da cor que se verificam visualmente: o Adina e o Adara formaram um cluster devido à sua semelhança em carotenóides que lhes confere uma cor alaranjados; o Zebra e o Zmira também se agruparam devido à sua semelhança em carotenóides e clorofilas, que lhes confere uma cor vermelha intensa com riscas verdes; o Shir é o único cultivar que não é cereja, no entanto a sua proximidade no PCA ao Zebra e ao Zmira deve-se à semelhança de cores; os cultivares Amonet e vulgar formam clusters independentes, no entanto o Amonet partilha semelhanças com este cultivar (cor vermelha) e com os cultivares Zmira e Zebra (variedade de carotenos).

Relativamente ao perfil dos espectros de absorvância de cada cultivar, foi possível identificarem-se os compostos com maior predominância nos respetivos cultivares. No dia 1 os cultivares Adina e Adara apresentavam uma predominância de feofitina *a*, clorofilas *a* e *b*, fitoflueno e algum ζ -caroteno e β -caroteno e licopeno. O Adara no dia 1 aparenta mais licopeno, β -caroteno, ζ -caroteno e menos clorofila *b* que o Adina. No estado maduro (dia 24) verifica-se uma predominância de β -zeacaroteno, ζ -caroteno, neurosporeno, zeaxantina, β -caroteno e ainda fitoflueno, licopeno, γ -caroteno e δ -caroteno. O Adara apresenta um perfil idêntico ao perfil do Adina, apenas aumentando de intensidade do ζ -caroteno e diminuindo a do licopeno. Os cultivares Amonet, Shir, Zebra e Zmira registam os mesmos picos de compostos no primeiro dia: fitoflueno, ζ -caroteno, feofitina, clorofilas *a* e *b* licopeno e β -caroteno. O pico do licopeno é mais alto no Zmira e mais baixo no Amonet. No estado maduro estas cultivares apresentam predominantemente licopeno, sendo também visível o β -caroteno. Destaca-se ainda o pico da feofitina que sobressai no Shir, no Zebra e no Zmira. Este facto é consistente com a presença de cor verde na película (riscas) e na polpa (envolvendo as sementes), o que torna este tomate de cor mais escura. O Amonet apresenta menor incidência dos picos de feofitina e das clorofilas, o que também é querente com a sua tonalidade vermelha clara.

Conclui-se assim que a cor laranja forte dos cultivares Adina e Adara derivam dos carotenóides ζ -caroteno, γ -caroteno e licopeno. Este facto leva ainda à conclusão de que a via metabólica (figura 4, p.14) dos carotenóides evolui tendencialmente no sentido da formação de β -caroteno. Por sua vez, os cultivares Shir, Amonet, Zebra, Zmira e vulgar

possuem uma tonalidade vermelha que deriva da maior incidência de licopeno. Assim, conclui-se que nestes carotenos a via metabólica evolui claramente no sentido deste caroteno. Foi ainda possível concluir que a tonalidade mais escura e o perfil raiado dos cultivares Shir, Zebra e Zmira se deve à presença de clorofilas (que originam feofitina no processo de extração).

A quantificação do licopeno revela uma tendência crescente, o que está de acordo com o perfil dos espectros dos quatro cultivares. Segundo os resultados quantificação o Zmira é o mais rico neste caroteno, seguido do Zebra, do Shir, do Vulgar, do Adina e do Adara. Os espectros estão em concordância com esse resultado, exceto para o Shir que revela um pico a 470 nm superior ao do Zebra. Conclui-se assim que a quantificação do licopeno está a sofrer uma certa interferência dos outros carotenóides, não devendo, no entanto, estar longe da realidade.

Já para o β -caroteno, os valores não estão coerentes com os espectros, e os resultados da quantificação refletem uma mistura de vários compostos. No entanto, apesar de os valores não estarem corretos, as tendências correspondem ao evoluir dos espectros. No caso concreto do tomate laranja, há ainda poucos estudos que refiram o seu conteúdo em carotenos, no entanto, com este trabalho concluiu-se que o β -caroteno não é o composto predominante. Para os cultivares em geral, conclui-se também que uma análise correta aos carotenos do tomate não deve contemplar apenas o licopeno e o β -caroteno, como é vulgar encontrar nos artigos científicos, isto porque nem sempre estes dois carotenos são os únicos presentes em quantidades significativas.

A metodologia da bioacessibilidade *in vitro* resultou com sucesso e o clorofórmio revelou-se uma boa alternativa para ser possível extrair os carotenóides do resultado da “digestão”. Com o processamento por alta pressão, a bioacessibilidade diminui em todas as cultivares. Este facto está aparentemente relacionado com alterações das fibras provocadas pela alta pressão, que provocam uma maior retenção dos carotenos, dificultando assim a acessibilidade das enzimas à digestão destes compostos.

Para o processamento por alta pressão a 500 MPa, durante 5 minutos (sem temperatura), concluiu-se que ocorria uma melhor extratabilidade dos carotenos, em especial nos cultivares Zebra e Zmira (aumentando cerca de 40% da extração). No entanto,

o Adina foi o único a sofrer um decréscimo na extratabilidade após alta pressão. Este facto parece estar associado à sua composição enzimática, que ao aplicar a AP, aumenta a atividade de oxidação por parte das enzimas. Para além disso, a relação entre antioxidantes hidrofílicos e as enzimas pode não ser suficiente para compensar a oxidação dos carotenóides pela componente enzimática. Aparentemente, a alta pressão causa ruturas nos tecidos e organelos das células do tomate, libertando os carotenóides das estruturas macromoleculares a que estão ligados. Conclui-se assim que a composição da matriz do tomate determina a libertação e estabilidade dos carotenos processados por alta pressão.

O tomate Amonet apresentou a maior atividade antioxidante hidrofílica, seguido do Shir, Adina, Adara, Zmira e Zebra. O processamento por alta pressão provocou um decréscimo da atividade antioxidante nas cultivares Adina, Adara, Amonet e Shir. As diferenças entre os resultados estão possivelmente relacionadas com a composição da matriz de cada cultivar de tomate, que podem ou não proteger os compostos antioxidantes do tomate. No entanto, seria necessário um estudo mais aprofundado da composição destes cultivares para poder chegar a uma teoria conclusiva.

Na quantificação de açúcares redutores o método IV-PLS resultou com sucesso, sendo uma alternativa eficaz e rápida na quantificação dos açúcares das amostras. Pode concluir-se que os cultivares laranjas possuem maior teor de açúcares, seguidos dos cultivares Zmira e Amonet com valores um pouco inferiores. Os cultivares Zebra e Shir registaram o menor teor de açúcares, cerca de metade em relação às outras variedades.

As pequenas oscilações que ocorreram quer ao nível do teor de açúcares redutores, quer ao nível da percentagem de água no tomate apresentam como causa provável as drásticas e atípicas oscilações de temperatura que se fizeram sentir entre os meses de abril e maio, meses esses que correspondem à época de plantação, vingamento e primeira maturação dos frutos em estudo.

4.1. Trabalho futuro

O método de extração necessita ainda de ser otimizado, uma vez que para a quantificação total de carotenos seria importante eliminar a interferência das clorofilas. Para uma quantificação fiel dos carotenos na amostra seria importante remover

praticamente a totalidade dos carotenos do tomate, ficando o resíduo sem coloração. No que diz respeito à obtenção dos espectros, era importante aumentar-se a gama de comprimento de onda (250 a 700 nm), de forma a obter uma maior amplitude dos espectros e poder calcular a concentração de cada caroteno com maior rigor. Agora que já se conhece o principal conteúdo de carotenos nas amostras em estudo, seria ainda importante efetuar uma reta de calibração para cada um, podendo assim determinar-se o teor de carotenos de cada cultivar.

Uma possibilidade passa pela utilização do HPLC para quantificar e identificar os diferentes carotenos. Desta forma, e tendo a certeza dos compostos presentes, seria possível desenvolver o modelo de quantificação por PLS com base nos espectros.

5. Referências Bibliográficas

- Agarwal, S. e Rao, A. V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association or its licensors*, 6, 739-744.
- Attokaran, M. (2011). Tomato. In Attokaran, M. (Ed.), *Natural Food Flavors and Colorants* (cap. 97, pp. 387-389). Danvers, MA: Wiley-Blackwell Publishing Ltd. e Institute of Food Technologists Press.
- Balasubramaniam, V. M. e Farkas, D. (2008). High-pressure Food Processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 413-418.
- Barba, F. J., Esteve, M. J. e Frigola, A. (2011). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*.
- Barros, A. (1999). *Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, PhD Thesis, Paris, France.
- Beckles, D. M. (2012). Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 129-140.
- BeMiller, J. N. (2010). Carbohydrate Analysis. In Nielsen, S. S. (Ed.), *Food Analysis* 4 ed., vol. 2 (cap. 10, pp. 152-154). USA: Springer.
- Bradley, R. L. (2010). Moisture and Total Solids Analysis. In Springer (Ed.), *Food Analysis* 4 ed., vol. 2 (pp. 85-89). USA: Nielsen, S. Suzanne.
- Burgess, C. (2007). The Basics of Spectrophotometric Measurement. In Thomas, O. e Burgess, C. (Eds.), *UV-visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*, vol. 27 (cap. 1, pp. 1-6). Startforth, England: Elsevier.
- Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H. e Erdman, J. W. (2005). The tomato as a functional food. *The Journal of Nutrition*, 1226-1230.
- Cano, A., Acosta, M. e Arnao, M. (2003). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Postharvest Biology and Technology*, 28, 59-65.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R. e de Vos, R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56(3), 964-973.
- Cazzonelli, C. I. e Pogson, B. J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 15(5), 266-274.
- Cheftel, J. C. (1992). Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. e Masson, P. (Eds.), *High-Pressure and Biotechnology*, vol. 224 (pp. 195-209). London, UK: John Libbey Eurotext Ltd.
- Clinton, S. K. (1998). Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews*, 56(2 Pt 1), 35-51.
- Coulter, T. P. (2002). *Food - The Chemistry of Its Components* (4 ed.): RSC Paperbacks.
- Cunningham, F. X. e Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(83), 557-677.
- Davis, R. e Mauer, L. J. (2010). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In Méndes-Vilas,

- A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education. Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2 (pp. 1582-1594). Badajoz, Spain: Formatex.
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C. e Zuo, J. (2007). The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research*, 17(5), 458-470.
- Duarte, I. F., Barros, A., Delgadillo, I., Almeida, C. e Gil, A. M. (2002). Application of FTIR Spectroscopy for the Quantification of Sugars in Mango Juice as a Function of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G. e Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 369-382.
- Eijkelhoff, C. e Dekker, J. P. (1997). A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis Research*, 52, 69-73.
- Faulks, R. M. e Southon, S. (2005). Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740(2), 95-100.
- FDA, Food and Drug Administration. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: high pressure processing. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/researchareas/safepacticesforfoodprocesses/ucm101456.htm> (Acedido a 29-12-11).
- Fernández-García, A., Butz, P. e Tauscher, B. (2001). Effects of High-pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Food Science*, 66(7), 1033-1038.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A. e Hornero-Méndez, D. (2011). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 13.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lerida, I. e Perez-Galvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751-760.
- Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D. e Whelpton, R. (2007). Colour Tests, and Spectrophotometric and Luminescence Techniques. In *Fundamentals of analytical toxicology* (cap. 95-103). England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gartner, C., Stahl, W. e Sies, H. (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 116-122.
- Georgé, S., Tourniaire, F., Geautier, H., Goupy, P., Rock, E. e Caris-Veyrat, C. (s.d.). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C. In *Safety and Quality of Plant Products and Conservation des Produits Agricoles*, (pp. 3). Avignon, France.

- Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E. e Caris-Veyrat, C. (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry*, 124(4), 1603-1611.
- Gross, J. A. (1987). *Pigments in Fruits*. London, UK: Academic Press.
- Grove, S. F., Lee, A., Lewis, T., Stewart, C. M., Chen, H. e Hoover, D. G. (2006). Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. *Journal of Food Protection*, 69(4), 957-968.
- Gupta, R., Kopec, R. E., Schwartz, S. J. e Balasubramaniam, V. M. (2011). Combined pressure-temperature effects on carotenoid retention and bioaccessibility in tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7808-7817.
- Hernández Suárez, M., Rodríguez Rodríguez, E. M. e Díaz Romero, C. (2008). Chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) from Tenerife, the Canary Islands. *Food Chemistry*, 106(3), 1046-1056.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 210-218.
- Hite, B. H. (1899). The effect of pressure in preserving milk. *West Virginia University. Agricultural Experiment Station*, 58, 15 – 35.
- Hogan, E., Kelly, A. L. e Sun, D.-W. (2005). High Pressure Processing of Foods: An Overview. In Sun, D.-W. (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing* (cap. 1, pp. 7-8). London, UK: Elsevier Ltd.
- Hsu, K.-C. (2008). Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 450-459.
- Hsu, K.-C., Tan, F.-J. e Chi, H.-Y. (2008). Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of pressurized tomato juice during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 367-375.
- Ilahy, R., Hdider, C., Lenucci, M. S., Tlili, I. e Dalessandro, G. (2011). Phytochemical composition and antioxidant activity of high-lycopene tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars grown in Southern Italy. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 6.
- Krzyzanowska, J., Czubačka, A. e Oleszek, W. (2010). Dietary Phytochemicals and Human Health. In Giardi, M. T., Rea, G. e Berra, B. (Eds.), *Bio-Farms for Nutraceuticals* (cap. 7, pp. 77-80). New York, USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.
- Lime, B. J., Griffiths, F. P., O'Connor, R. T., Heinzelman, D. C. e McCall, E. R. (1957). Spectrophotometric methods for determining pigmentation - beta-carotene and lycopene - in ruby red grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(12), 941-944.
- Maitland, J. E., Boyer, R. R., Eifert, J. D. e Williams, R. C. (2011). High hydrostatic pressure processing reduces *Salmonella enterica* serovars in diced and whole tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 113-117.
- Marczenko, Z. e Balcerzak, M. (2000). Principles of Spectrophotometry. In V., E. S. B. (Ed.), *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis* 1ª ed., vol. 10 (cap. 2, pp. 26-30). Poland: Elsevier.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G. e Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323-330.

- McClements, D. J., Decker, E. A. e Park, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Food Science and Nutrition*, 49(1), 48-67.
- McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M. e Bird, A. R. (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 543-548.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Naika, S., de Jeude, J. v. L., de Goffau, M., Hilmi, M. e van Dam, B. (2006). *A cultura do tomate - Produção, processamento e comercialização* (vol. 17, pp. 10-16). Wageningen, Netherlands: Fundação Agromisa e CTA, Wageningen.
- Nelson, D. L. e Cox, M. M. (2005). Carbohydrates and Glycobiology In *Principles of Biochemistry* (cap. 7, pp. 239-247): Lehninger.
- Nguyen-Quoc, B. e Foyer, C. H. (2001). A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52, 881-889.
- Nidhi, B. e Baskaran, V. (2010). Influence of Vegetable Oils on Micellization of Lutein in a Simulated Digestion Model. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 367-372.
- Olsson, S. (1995). Production equipment for commercial use. In Ledward, D. A., Johnston, D. E., Earnshaw, R. G. e Hastings, A. P. M. (Eds.), *High Pressure Processing of Foods* (cap. 12, pp. 167-180). Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S. e Sala, F. J. (1999). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 243-249.
- Pauling, L. (1964). *College Chemistry: An introductory textbook of general chemistry*. San Francisco, USA: Freeman and company.
- Pedro, A. M. e Ferreira, M. M. (2007). Simultaneously calibrating solids, sugars and acidity of tomato products using PLS2 and NIR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 595(1-2), 221-227.
- Petro-Turza, M. (1987). Taste of tomato and tomato products. *Food Reviews International*, 2(3), 309-351.
- Pizza and Delivery. (2009). *Solanum Lycopersicum, simplesmente... Tomate. Pizza and Delivery*, (vol. 1, pp. 35-36). Brasil: Insumos.
- Poole, R. K. e Kalnenieks, U. (2000). Introduction to light absorption: visible and ultraviolet spectra. In Gore, M. G. (Ed.), *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry - A Practical Approach* (cap. 1, pp. 1-6). Látvia e Inglaterra: Oxford University Press, 2000.
- Porra, R. J., Thompson, A. A. e Kriedemann. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verifications of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, 384-394.
- Porretta, S., Birzi, A., Ghizzoni, C. e Vicini, E. (1995). Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice. *Food Chemistry*, 52(1), 35-41.

- Prior, R. L., Wu, X. e Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pub Chem Compound (NCB). (2011). Beta Carotene. Disponível em: [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280489#](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280489#[27)[27 (Acedido a 13-01-12).
- Qiu, W., Jiang, H., Wang, H. e Gao, Y. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. *Food Chemistry*, 97(3), 516-523.
- Rajchl, A., Voldřich, M., Čížková, H., Hronová, M., Ševčík, R., Dobiáš, J. e Pivoňka, J. (2010). Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. *Journal of Food Engineering*, 99(4), 465-470.
- Rao, A. V. e Agarwal, S. (1998). Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutrition and Cancer*, 31(3), 199-203.
- Rao, A. V. e Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K. e Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.
- Regulamento (CE) N.º 1924/2006 do Parlamento europeu e do Conselho de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. Jornal Oficial da União Europeia (2006).
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *Guide to Carotenoid Analysis in Food* (pp. 14-19). USA: ILSI Press.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726-740.
- Rufino, M. d. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., de Moraes, S. M., Sampaio, C. d. G., Pérez-Jiménez, J. e Saura-Calixto, F. D. (2007). Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf (Acedido a 05-03-2012).
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B. e Cano, M. P. (2003). Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 647-653.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B. e Cano, M. P. (2006a). Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato purée on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 171-179.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B. e Cano, M. P. (2006b). Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, 98(4), 749-756.
- Schumann, K., Classen, H. G., Hages, M., Prinz-Langenohl, R., Pietrzik, K. e Biesalski, H. K. (1997). Bioavailability of oral vitamins, minerals, and trace elements in perspective. *Arzneimittelforschung*, 47(4), 369-380.
- Shi, J. e Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(4), 293-334.

- Siems, W., Wiswedel, I., Salerno, C., Crifo, C., Augustin, W., Schild, L., Langhans, C. D. e Sommerburg, O. (2005). Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions--potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(7), 385-397.
- Sies, H. e Stahl, W. (1998). Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 121-124.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 152-158.
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (2nd ed.): CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.
- Stommel, J. R. (1992). Enzymic Components of Sucrose Accumulation in the Wild tomato species *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Physiology*, 99, 324-328.
- Suárez-Jacobo, Á., Rüfer, C. E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X. e Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, 127(2), 447-454.
- Svelander, C. (2011). *In vitro Bioaccessibility of Carotenoids - Influence of microstructure in tomato and carrot modified by processing*. Chalmers University of Technology, Department of Chemical and Biological Engineering. Doctor Degree, Göteborg, Sweden.
- Swetman, A. A., Nicolaidis, L., Wareing, P. W., New, J. H., Wood, J. F. e Hammond, L. (2002). Chapter 8: Food Processing and Preservation. In Golob, P., Farrell, G. e Orchard, J. E. (Eds.), *Crop Post-Harvest: Science and Technology, Principles and Practice* 1ª ed., vol. 1 (cap. 363, p. 577). Gosport, UK: Blackwell Science Ltd.
- Takeoka, G. R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D. M., Jewell, W. T., Huebner, B., Bertow, D. e Ebeler, S. E. (2001). Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (8), 3713-3717.
- Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z Lebensm Unters Forsch*, 200(1), 3-13.
- University of Colorado at Boulder, D. o. C. a. B. (2002). IR Spectroscopy: Theory. In *The Electromagnetic Spectrum* vol. 15 (pp. 155-164). Organic Chemistry at CU Boulder: Online edition for students of organic chemistry lab courses at the University of Colorado, Boulder, Dept of Chem and Biochem.
- USDA, United States Department of Agriculture (2011). National Nutrient Database for Standard Reference - Raw tomato, 11529; catsup, 11935; tomato juice, 11540; tomato sauce, 11549; tomato soup, 06359. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list> (Acedido a 29-12-11).
- Vermeir, S., Beullens, K., Mészáros, P., Polshin, E., Nicolaï, B. M. e Lammertyn, J. (2009). Sequential injection ATR-FTIR spectroscopy for taste analysis in tomato. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 715-721.
- Werner, S. e Bohm, V. (2011). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin e from pasta: evaluation of an in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1163-1170.
- Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F. e Sporns, P. (2001). *Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry* (vol. F2.2): John Wiley & Sons, Inc.

- Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F. e Sporns, P. (2001). *Gravimetric Determination of Water by Drying and Weighing. Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. (vol. A1.1): John Wiley & Sons, Inc.
- Xiaobo, Z., Jiewen, Z., Povey, M. J. W., Holmes, M. e Hanpin, M. (2010). Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 667(1-2), 14-32.
- Yeung, D. L. e Laquatra, I. (2003). Heinz handbook of nutrition. In 9^a ed. (cap. 4, pp. 70-71). USA: Heinz Company.

Anexos

Anexo I - Algumas características gerais dos carotenóides

Tabela A.I. 1 - Comparação da atividade antioxidante de carotenóides (adaptado de Shi e Le Maguer, 2000).

Capacidade de captação do oxigênio "singlet", Kq (m-1s-1)	
Licopeno	31
γ -caroteno	25
α -caroteno	19
β -caroteno	14
Luteína	8
Astaxantina	24
Bixina	14
Cantaxantina	21
Zeaxantina	10

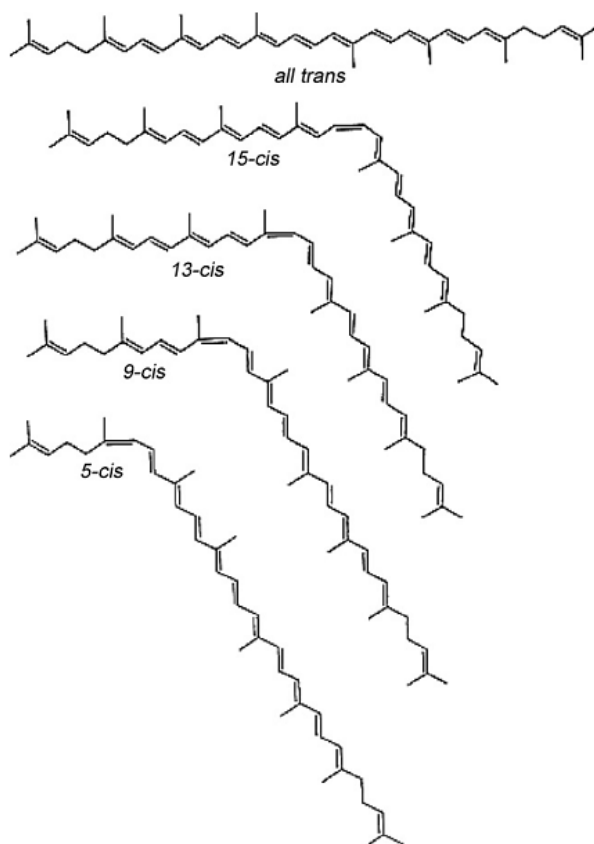


Figura A.I. 1 - Representação das estruturas químicas de todos os isômeros do licopeno (Rao e Rao, 2007).

Anexo II – Quinta da Azinhaga

Situada na freguesia de Nariz, vertente sul do concelho de Aveiro, a Quinta da Azinhaga é uma exploração agrícola de suaves relevos, cuja área detém cerca de 12 hectares. Nos seus cultivos predominam os produtos hortícolas e as árvores de fruto. Possuem ainda, em harmoniosa liberdade, cavalos Puro Sangue Lusitano, veados e gado bovino. Na produção hortícola, já utiliza práticas amigas do ambiente com o objetivo de obter a certificação de Produtor Biológico. É produtora de composto orgânico que foi credenciado pela Escola Superior Agrária de Santarém.

Visão: “Somos **fãs da Natureza** e queremos conquistar novos adeptos”.

Missão: “Deter as melhores técnicas de produção, utilizá-las como práticas amigas do ambiente, obter produtos de qualidade superior, conquistar e fidelizar os nossos clientes, são objetivos que estarão sempre presentes no nosso projeto agrícola.”

Política: “Prezamos a **excelência na qualidade** e é com essa atitude, que pretendemos ter maior visibilidade junto dos nossos clientes. A **paixão pela natureza** conduziu-nos ao respeito pelos princípios mais elementares patentes nos equilíbrios biológicos que se observam em tudo o que à nossa volta é vida. Respeitamos escrupulosamente essas regras: na alimentação dos animais, na fertilização das nossas culturas (onde a base é o composto orgânico que produzimos) e nas técnicas de cultivo mais avançadas. Tendo presente que o nosso projeto agrícola tem como primeiro grande objetivo a utilização de práticas amigas do ambiente, continuaremos, afincadamente, a conduzir as nossas ações no caminho que nos leva ao estatuto de **Produtor Biológico.**”

Anexo III – Resultados

Tabela A.III. 1 – Quantificação de β -caroteno e licopeno em diferentes estados de maturação do tomate.

Dias	Amostra	β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	Licopeno ($\mu\text{g/g}$)
1	Adina	6.347 \pm 1.27	1.778 \pm 0.22
11	Adina	5.539 \pm 0.76	2.752 \pm 0.26
15	Adina	5.178 \pm 0.06	2.901 \pm 0.04
19	Adina	19.024 \pm 5.56	7.465 \pm 1.42
24	Adina	32.772 \pm 1.13	8.821 \pm 0.30
24	Adina AP	27.080 \pm 1.18	8.333 \pm 0.13
1	Adara	4.585 \pm 1.34	2.051 \pm 0.20
11	Adara	4.281 \pm 0.84	2.460 \pm 0.20
15	Adara	5.091 \pm 0.26	2.992 \pm 0.08
19	Adara	16.965 \pm 2.10	5.074 \pm 0.61
24	Adara	19.983 \pm 0.52	5.824 \pm 0.25
24	Adara AP	16.170 \pm 1.11	6.136 \pm 0.20
1	Amonet	4.691 \pm 0.46	2.479 \pm 0.34
11	Amonet	4.382 \pm 0.60	2.563 \pm 0.15
15	Amonet	6.732 \pm 0.63	5.634 \pm 0.19
19	Amonet	8.253 \pm 2.23	10.363 \pm 1.71
24	Amonet	10.303 \pm 0.48	29.975 \pm 2.82
24	Amonet AP	14.209 \pm 0.32	35.108 \pm 1.19
1	Shir	9.601 \pm 1.61	0.505 \pm 0.34
11	Shir	6.189 \pm 1.00	2.462 \pm 0.06
15	Shir	8.328 \pm 1.46	4.530 \pm 0.51
19	Shir	11.322 \pm 1.93	6.738 \pm 0.73
24	Shir	12.604 \pm 1.03	32.728 \pm 1.47
24	Shir AP	16.814 \pm 0.69	40.858 \pm 1.10
1	Zebra	7.091 \pm 1.38	2.154 \pm 0.33
11	Zebra	7.559 \pm 1.27	2.649 \pm 0.63
15	Zebra	9.841 \pm 0.53	10.874 \pm 0.43
19	Zebra	14.564 \pm 2.49	25.120 \pm 4.90
24	Zebra	21.775 \pm 1.43	64.281 \pm 7.74
24	Zebra AP	27.660 \pm 0.83	92.301 \pm 4.98
1	Zmira	8.453 \pm 2.06	1.879 \pm 0.76
11	Zmira	7.581 \pm 1.50	2.551 \pm 0.19
15	Zmira	15.732 \pm 0.65	25.760 \pm 0.93
19	Zmira	24.541 \pm 2.43	51.822 \pm 7.07
24	Zmira	21.461 \pm 1.57	78.217 \pm 16.09
24	Zmira AP	28.734 \pm 3.70	109.300 \pm 9.12
	Vulgar	4.376 \pm 0.07	16.552 \pm 1.46

Tabela A.III. 2 – Atividade antioxidante do tomate maduro pelo radical livre DPPH. Percentagem de DPPH em função da concentração de tomate.

Tomate	Tomate (mg/ml)	% DPPH restante	EC ₅₀ (mg/ml)	Tomate	Tomate (mg/ml)	% DPPH restante	EC ₅₀ (mg/ml)
Adina	0.00	100.00	709.30	Adina AP	-	100	762.55
	20.09	94.90 ± 0.48			20.08	97,15 ± 0.08	
	50.16	93.39 ± 0.60			50.20	94.44 ± 0.48	
	70.22	91.97 ± 0.62			70.27	93.11 ± 0.60	
	100.31	90.68 ± 0.35			100.39	91.46 ± 0.55	
	250.78	81.27 ± 2.07			250.98	83.10 ± 1.24	
Adara		100	722.92	Adara AP		100	906.84
	20.17	94.72 ± 0.90			20.10	98.21 ± 0.24	
	50.42	93.71 ± 0.92			50.25	96.60 ± 0.16	
	70.58	92.56 ± 1.10			70.35	95.04 ± 0.28	
	100.83	90.82 ± 1.32			100.49	93.34 ± 0.21	
	252.08	83.38 ± 2.43			251.23	86.00 ± 0.83	
Amonet		100.00	476.96	Amonet AP		100	632.05
	20.11	95.27 ± 1.85			20.12	96.65 ± 0.29	
	50.27	92.33 ± 1.70			50.29	93.99 ± 0.40	
	70.37	90.45 ± 2.14			70.41	92.88 ± 0.52	
	100.53	86.91 ± 2.20			100.58	90.54 ± 0.62	
	251.33	73.37 ± 2.84			251.45	79.66 ± 1.28	
Shir		100	610.17	Shir AP		100	861.48
	20.02	93.99 ± 0.48			21.14	96.83 ± 0.28	
	50.06	92.33 ± 0.69			52.84	94.77 ± 0.28	
	70.08	90.50 ± 1.33			73.98	93.80 ± 0.36	
	100.12	87.70 ± 1.04			105.69	91.92 ± 0.08	
	250.29	78.65 ± 0.36			264.22	84.07 ± 0.35	
Zebra		100	802.69	Zebra AP		100	757.84
	20.13	100.05 ± 0.08			20.20	95.68 ± 0.94	
	50.33	97.70 ± 0.08			50.49	94.08 ± 0.36	
	70.46	96.37 ± 0.69			70.69	92.93 ± 0.32	
	100.66	93.85 ± 0.48			100.98	91.37 ± 0.16	
	251.64	84.80 ± 0.64			252.45	82.46 ± 0.42	
Zmira		100	737.62	Zmira AP		100.00	587.18
	20.20	96.83 ± 0.63			20.09	95.73 ± 0.72	
	50.50	94.72 ± 0.42			50.23	93.34 ± 0.56	
	70.70	93.48 ± 0.57			70.32	91.87 ± 0.99	
	101.00	90.22 ± 1.31			100.45	89.53 ± 0.63	
	252.50	82.60 ± 1.12			251.13	78.05 ± 0.69	

Tabela A.III. 3 – Quantificação dos açúcares dos cultivares Adara, Amonet e Zebra maduros de uma plantação do ano de 2011. Valores obtidos por duas técnicas espectrofotométricas com recurso a reagentes diferentes: ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fenol-sulfúrico.

Método	Tomate (µg/ml)	Açúcar (mg/100 g)
DNS	Adara	3.521 ± 0.04
	Amonet	1.696 ± 0.12
	Zebra	2.300 ± 0.19
Fenol-sulfúrico	Adara	2.967 ± 0.15
	Amonet	1.321 ± 0.043
	Zebra	1.955± 0.14

Tabela A.III. 4 – Quantificação de açúcares redutores nas amostras de tomate por espectrofotometria UV/Vis e espectroscopia de infravermelho.

Dias	Tomate	DNS (espectrofotometria)			PLS (IV)						
		Açúcar (g/ 100g)	Desvio Padrão	Coefficiente variação	Glucose (g/ 100g)	Desvio padrão	Coefficiente de variação	Frutose (g/ 100g)	Desvio padrão	Coefficiente de variação	Açúcar (g/100 g)
1	Adina	1.373	0.00	1.41	0.560	0.35	5.78	1.071	0.46	4.02	1.631
11	Adina	2.185	0.00	1.02	1.339	0.12	0.87	1.201	0.51	4.03	2.540
15	Adina	2.107	0.00	2.00	0.647	0.28	4.07	1.225	0.55	4.23	1.873
19	Adina	3.282	0.00	1.63	2.263	0.26	1.08	1.818	0.29	1.48	4.082
24	Adina	4.897	0.00	0.84	2.767	0.56	1.83	3.108	2.86	8.39	5.875
1	Adara	2.007	0.00	2.24	1.038	0.38	3.44	0.971	0.44	4.21	2.008
11	Adara	2.326	0.00	1.22	1.474	0.34	2.14	1.361	0.43	2.95	2.835
15	Adara	2.063	0.00	0.77	1.147	0.63	5.12	1.502	0.15	0.94	2.649
19	Adara	3.680	0.00	1.20	2.485	0.25	0.94	2.062	0.56	2.52	4.547
24	Adara	4.463	0.00	0.34	2.817	0.10	0.31	3.428	1.21	3.24	6.246
1	Amonet	1.641	0.01	4.48	0.731	0.36	4.57	0.980	0.39	3.74	1.711
11	Amonet	1.852	0.00	0.98	1.091	0.45	3.89	0.890	0.41	4.35	1.982
15	Amonet	1.988	0.00	0.30	1.446	0.39	2.54	1.798	0.69	3.58	3.244
19	Amonet	2.528	0.00	2.05	1.588	0.39	2.31	1.120	0.65	5.40	2.708
24	Amonet	4.728	0.00	0.77	3.013	0.62	1.91	2.049	1.55	6.97	5.062
1	Shir	2.443	0.00	0.83	0.992	0.33	3.11	0.756	0.45	5.53	1.747
11	Shir	2.148	0.00	0.82	1.535	0.22	1.34	0.774	0.35	4.26	2.310
15	Shir	2.387	0.00	0.77	1.786	0.29	1.51	1.395	0.19	1.30	3.181
19	Shir	2.741	0.00	1.09	2.047	0.48	2.17	1.393	1.25	8.32	3.440
24	Shir	2.544	0.00	0.00	1.635	0.44	2.52	1.312	0.72	5.11	2.947
1	Zebra	2.687	0.01	2.17	1.591	0.37	2.13	1.112	0.36	3.04	2.703
11	Zebra	2.170	0.00	0.62	1.571	0.38	2.26	1.084	0.51	4.34	2.654
15	Zebra	2.344	0.00	0.52	1.759	0.40	2.09	1.706	0.23	1.25	3.466
19	Zebra	2.761	0.00	1.08	1.986	0.90	4.20	1.881	1.19	5.83	3.867
24	Zebra	3.772	0.00	2.03	2.110	0.30	1.33	1.760	0.33	1.75	3.871
1	Zmira	2.383	0.01	3.20	1.439	0.31	1.98	0.880	0.09	0.92	2.319
11	Zmira	2.268	0.00	0.22	1.572	0.53	3.15	1.054	0.48	4.18	2.625
15	Zmira	2.592	0.00	0.85	1.992	0.23	1.07	1.735	0.39	2.08	3.726
19	Zmira	3.486	0.00	1.60	2.706	0.56	1.90	3.047	1.20	3.60	5.753
24	Zmira	4.492	0.00	2.90	2.669	0.88	3.02	2.614	6.42	22.47	5.283

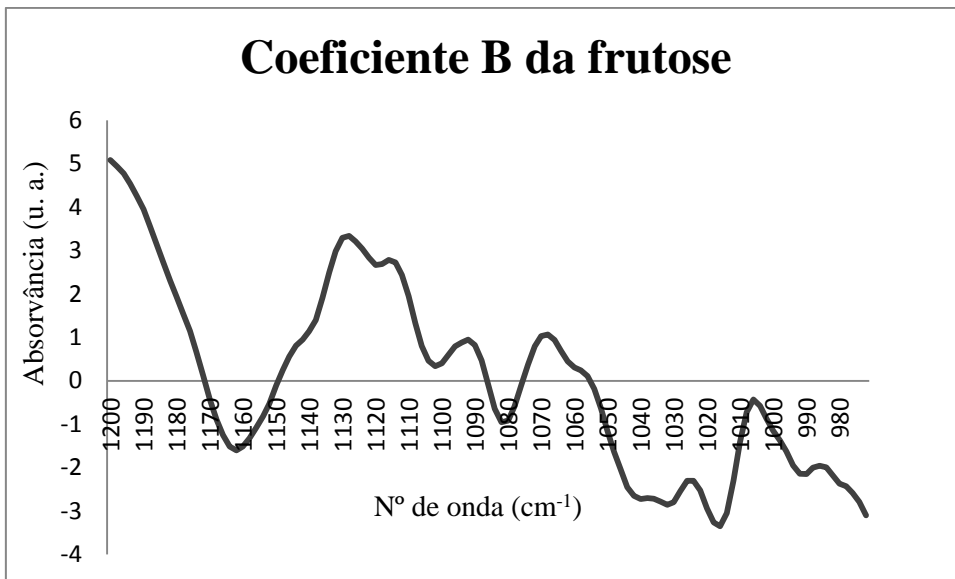


Figura A.III. 1 - Vetores b obtidos pelo PLS1, com 4 variáveis latentes para a frutose.

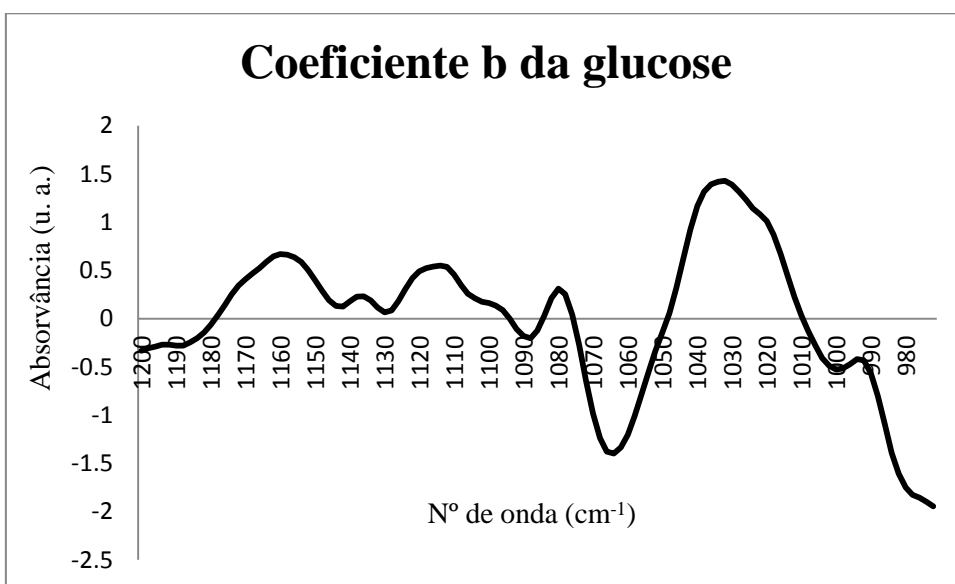


Figura A.III. 2 - Vetores b obtidos pelo PLS1, com 4 variáveis latentes para a glucose

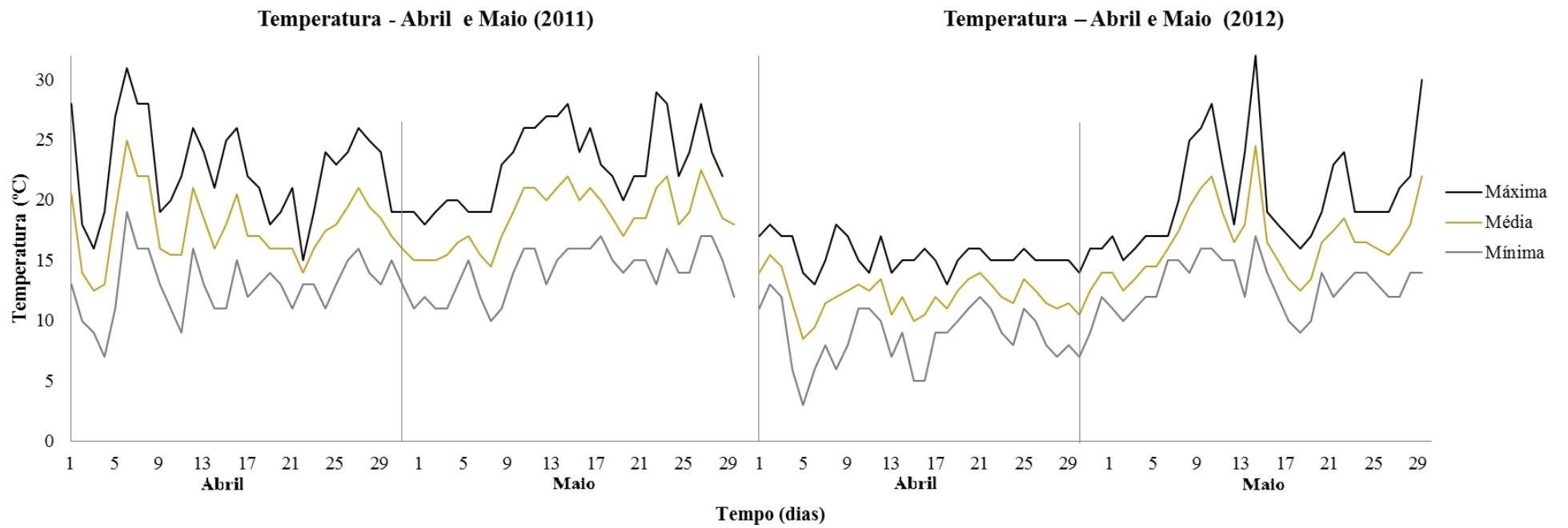


Figura A.III. 3 - Registo de temperaturas nos meses de Abril e Maio para os anos de 2011 e 2012.