

Ana Beatriz Carvalho Elvas

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde.

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

(Versão Final)

Julho 2016



Ana Beatriz Carvalho Elvas

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde.

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Orientadores:

Prof. Doutora Dulcineia Ferreira Wessel

Co-orientadores:

Prof. Doutor Fernando Gonçalves

Doutora Susana Cardoso (QOPNA-UA)

Julho 2016



Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária
do Instituto Politécnico de Viseu para obtenção do
grau de Mestre em Qualidade e Tecnologia Alimentar

“As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.”

Agradecimentos

A toda a minha família por todo o apoio e força que me deram ao longo de todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Dulcineia Maria Sousa Ferreira Wessel, minha orientadora e aos meus co-orientadores, Professor Doutor Fernando Gonçalves e Doutora Susana Maria Almeida Cardoso, agradeço a excelente orientação científica, a ajuda prestada na revisão do trabalho, os esclarecimentos, opiniões e sugestões. Agradeço também a total disponibilidade em todo o trabalho desenvolvido, o auxílio na condução do trabalho experimental, pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda, colaboração, amizade e por todo o apoio.

Ao Engenheiro António Pinto pela ajuda, apoio, amizade e disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Ao Engenheiro Rui Coutinho e à D^a Etelvina pela ajuda e pelos momentos passados no laboratório.

Às minhas colegas de curso que estiveram por perto na minha vida académica em particular, o meu especial obrigado, à Solange Oliveira, Sónia Andrade e Ana Costa, por todos os bons momentos passados juntas e por todo o apoio prestado.

O meu obrigado a todos!

Resumo

O desenvolvimento de alimentos funcionais evoluiu consideravelmente ao longo dos anos e a capacidade tecnológica para produzir um alimento com compostos fisiologicamente ativos tem crescido significativamente. O presente trabalho teve como objetivo criar um novo alimento, utilizando um subproduto proveniente da indústria agroalimentar. O alimento seleccionado foi o iogurte natural, o qual foi enriquecido com um extrato de bagaço de maçã. O bagaço de maçã contém compostos fenólicos e fibra, mostrando atividade antioxidante significativa e por conseguinte apresenta um potencial efeito positivo na saúde.

Avaliaram-se características químicas do bagaço de maçã e das farinhas obtidas a partir deste subproduto, designadamente: acidez, teor em açúcares totais e redutores, cinza, matéria gorda, humidade, proteína bruta, fibra dietética insolúvel e solúvel. O extrato aquoso obtido a partir do subproduto foi também caracterizado quanto ao seu conteúdo fenólico e atividade antioxidante. O iogurte produzido com incorporação do extrato de bagaço de maçã foi estudado do ponto de vista de parâmetros químicos tais como acidez, açúcares totais, cinza, humidade, proteína bruta, pH e fibra bruta, conteúdo em fenólicos totais e atividade antioxidante. O subproduto, os extratos e o iogurte foram também avaliados quanto à sua carga microbiológica.

Na caracterização química do bagaço foram obtidos os seguintes valores, expressos em base seca: $2,0 \pm 0,01\%$ de acidez (expressa em equivalentes de ácido málico); $15,96 \pm 1,53\%$ de açúcares totais; $13,35 \pm 1,91\%$ de açúcares redutores; $1,88 \pm 0,07\%$ de cinza, $2,49 \pm 0,5\%$ de matéria gorda, $81,17 \pm 1,98\%$ de humidade e $5,01 \pm 0,01\%$ de proteína bruta. Quanto ao seu conteúdo em fibra dietética, o bagaço contém na sua composição $65,80\%$ de fibra dietética insolúvel e $4,90\%$ de fibra dietética solúvel.

A farinha obtida após secagem a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do bagaço de maçã apresentou, na base seca, $1,9 \pm 0,04\%$ de acidez, $10,57 \pm 1,31\%$ de açúcares totais; $8,50 \pm 1,00\%$ de açúcares redutores; $2,22 \pm 0,04\%$ de cinza, $4,73 \pm 0,11\%$ de matéria gorda, $6,34 \pm 0,62\%$ de humidade e $5,40 \pm 0,26\%$ de proteína.

A atividade antioxidante do extrato aquoso, (AQ_6X10) obtido do bagaço de maçã, utilizado para incorporação no iogurte, determinada através do método ABTS foi de $5,00 \pm 1,28\text{ }\mu\text{mol TE/g}$ amostra e apresentou um teor em compostos fenólicos de $221,42 \pm 0,734\text{ mg EAG/ }100\text{g}$ de extrato, na base seca. Ao nível microbiológico o extrato revelou parâmetros aceitáveis, de acordo com a tabela 13 (anexos 3), para utilização como ingrediente alimentar.

Os iogurtes produzidos foram analisados quimicamente. O iogurte, com extrato aquoso de bagaço de maçã incorporado, apresentou $89,64 \pm 0,00\%$ de humidade, $0,93 \pm 0,00\%$ de acidez (expressa em equivalentes de ácido láctico); $6,42 \pm 0,26\%$ de açúcares totais; $0,74\% \pm 0,00\%$ de cinza, $3,83 \pm 0,00\%$ de proteína bruta e $0,2 \pm 0,00\%$ de fibra bruta. O seu conteúdo em compostos fenólicos foi de $12,41 \pm 1,69$ mg EAG/ 100g de iogurte, e a sua atividade antioxidante foi $54,84 \pm 4,40$ μ mol TE/g iogurte. Avaliou-se ainda o iogurte no que diz respeito ao crescimento de bactérias lácticas e constatou-se, por comparação com o iogurte de controlo, que estas se desenvolveram normalmente ao longo do processo de fabrico. A análise microbiológica revelou ainda que o iogurte é seguro do ponto de vista alimentar de acordo com a Tabela 15 (anexos 3). A análise sensorial realizada aos iogurtes demonstrou que o iogurte fortificado apresentou uma aceitação muito boa pelo painel de provadores.

O presente estudo demonstrou que o bagaço de maçã, um subproduto das indústrias agroalimentares, é seguro do ponto de vista microbiológico, podendo ser utilizado na preparação de ingredientes alimentares para serem incorporados, por exemplo em iogurte, conferindo-lhe características que se destacam pelo maior teor em fibra e atividade antioxidante em relação ao iogurte não enriquecido, e atributos sensoriais apelativos em termos de textura e sabor.

Palavras-chave: Bagaço de maçã, subproduto, compostos fenólicos, atividade antioxidante, fibra dietética, iogurte.

Abstract

The development of functional foods has evolved considerably over the years, and the technological capacity to produce food with physiologically active compounds has grown significantly. The aim of this study was to develop a new food using by-products from an agri-food industry. Here we describe a natural yoghurt enriched with an aqueous extract of apple pomace, Apple pomace contains phenolic compounds and fibers showing significant antioxidant activity, and thus exhibits a potential positive effect on health.

The apple pomace and a flour obtained from it were investigated with respect to their chemical characteristics such as, acidity, reduced sugars and total sugar content, ash, fat, moisture, crude protein, and soluble and insoluble dietary fiber. An aqueous extract was obtained from the apple pomace and analyzed with regard to phenolic content and antioxidant activity. Chemical parameters of the yoghurt produced with the aqueous extract were also analyzed such as, acidity, total sugar content, ash, moisture, crude protein, crude fiber, pH, total phenolic compounds, and total antioxidant activity. The apple pomace, the aqueous extract and yoghurt enriched were also evaluated for microbiological load.

For the chemical characterization of apple pomace the following values were obtained, expressed on a dry basis: $2.0 \pm 0.01\%$ of acidity (expressed as malic acid equivalents); $15.96 \pm 1.53\%$ total sugars; $13.35 \pm 1.91\%$ reducing sugars; $1.88 \pm 0.07\%$ ash, $2.40 \pm 0.50\%$ fat, $81.17 \pm 1.98\%$ humidity, $5.01 \pm 0.01\%$ crude protein, 65.80% insoluble dietary fiber and 4.90% of soluble dietary fiber .

The flour obtained after drying apple pomace at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ showed, on a dry basis, $1.9 \pm 0.04\%$ of acidity, $10.57 \pm 1.31\%$ total sugar; $8.50 \pm 1.00\%$ reducing sugars; $2.22 \pm 0.04\%$ ash, $4.73 \pm 0.11\%$ fat, $6.34 \pm 0.62\%$ humidity and $5.40 \pm 0.26\%$ crude protein.

The antioxidant activity of the aqueous extract, obtained from apple pomace, used in the yoghurt, determined by the ABTS method was $5.00 \pm 1.28\text{ }\mu\text{mol}$ as trolox equivalent (TE)/g and showed a content of phenolic compounds of $221.42 \pm 0.734\text{ mg}/100\text{g}$, expressed as equivalent of gallic acid (EGA) and on a dry basis. At the microbiological level the extract showed acceptable parameters, according to table 16 (annex 3), for use as a food ingredient.

The yoghurts produced were analyzed chemically. The yoghurt with aqueous extract incorporated had $0.93 \pm 0.00\%$ of acidity (expressed as lactic acid equivalent); $6.42 \pm 0.26\%$ total sugars; $0.74 \pm 0.00\%$ ash, $89.64 \pm 0.00\%$ humidity, $3.83 \pm 0.00\%$ crude protein was and $0.2 \pm 0.00\%$ of

crude fiber. The content of phenolic compounds was 12.41 ± 1.69 mg EGA/100g of yoghurt, their antioxidant activity by ABTS method was 54.84 ± 4.40 TE $\mu\text{mol/g}$ of yoghurt. The growth of lactic acid bacteria in the yoghurt was evaluated, and, by comparison with the control yoghurt, it was found that they developed normally throughout the manufacturing process. Microbiological analysis further revealed that the yoghurt is safe for food application, according to table 16 (annex 3). Sensory analysis demonstrated that the yoghurts have a very good acceptance by the panel of tasters.

This study demonstrated that apple pomace, a by-product from food industries, is safe from a microbiological point of view and may be used in preparation of food ingredients to be incorporated e.g. into yoghurt, giving it characteristics which are highlighted by a higher content of fiber and antioxidant activity compared to non-enriched yogurt and appealing sensory attributes in terms of texture and flavor.

Keywords: apple pomace, by-product, phenolic compounds, antioxidant activity, dietary fiber, yoghurt.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
I. INTRODUÇÃO	- 1 -
1. Enquadramento Geral.....	- 2 -
2. Objetivo	- 3 -
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	- 4 -
3. Produção Mundial de Maçã e Valor Nutricional.....	- 5 -
4. Bagaço de Maçã	- 8 -
4.1. Propriedades Nutricionais.....	- 10 -
4.2. Fibra Dietética	- 11 -
4.3. Compostos Fenólicos	- 14 -
4.3.1. Maçãs e Compostos Fenólicos.....	- 15 -
4.3.2. Ácidos fenólicos	- 17 -
4.3.3. Flavonóides	- 18 -
4.4. Atividade antioxidante	- 19 -
5. Alimentos Funcionais	- 22 -
6. Iogurtes	- 23 -
6.1. Descrição evolutiva histórica.....	- 23 -
6.2. Processo Produtivo do iogurte	- 24 -
6.3. Valor Nutricional e Benefícios para a Saúde.....	- 25 -

III. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	- 27 -
7. Material e métodos.....	- 28 -
7.1. Bagaço.....	- 28 -
7.2. Caracterização Química do Bagaço de Maçã e Farinhas.....	- 29 -
7.2.1. Determinação da Humidade	- 29 -
7.2.2. Determinação da acidez total.....	- 29 -
7.2.3. Determinação dos Açúcares Totais e Redutores.	- 30 -
7.2.4. Determinação das Cinzas	- 32 -
7.2.5. Determinação da Matéria Gorda.....	- 34 -
7.2.6. Determinação do Teor de Proteína.....	- 34 -
7.2.7. Determinação da Fibra Dietética Solúvel e Insolúvel	- 36 -
8. Obtenção de Extratos	- 39 -
8.1. Determinação dos Compostos Fenólicos.....	- 40 -
8.2. Determinação da Atividade antioxidante	- 41 -
9. Metodologias Microbiológicas	- 42 -
9.1.1. Preparação dos meios de cultura	- 43 -
9.1.2. Preparação das solução mãe e diluições	- 43 -
9.1.3. Determinação dos Microrganismos.....	- 43 -
10. Iogurtes.....	- 44 -
10.1. Formulação dos iogurtes	- 44 -
10.2. Caracterização Química	- 45 -
10.2.1. Determinação dos Açúcares Totais	- 46 -
10.2.2. Determinação da fibra bruta.....	- 47 -
10.2.3. Determinação do pH	- 48 -
10.3. Obtenção de Extratos a partir do iogurte.....	- 48 -
10.4. Metodologias Microbiológicas	- 48 -
10.4.1. Método de Breed.....	- 49 -
10.4.2. Preparação dos meios de cultura	- 49 -
10.4.3. Preparação das soluções Mães e Diluições	- 49 -
10.4.4. Determinação do Crescimento das Bactérias Lácticas	- 49 -
10.5. Análise Sensorial.....	- 50 -
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 51 -
11. Apresentação e Discussão de Resultados	- 52 -
11.1. Caracterização Química do Bagaço de Maçã e Farinhas	- 52 -
11.1.1. Determinação da Humidade	- 52 -
11.1.2. Determinação da Acidez	- 53 -
11.1.3. Determinação dos Açúcares Redutores e Totais	- 53 -

11.1.4.	Determinação das Cinzas	- 55 -
11.1.5.	Determinação da Fibra Dietética.....	- 55 -
11.1.6.	Determinação da Matéria Gorda.....	- 56 -
11.1.7.	Determinação da Proteína Bruta.....	- 57 -
11.2.	Caracterização Microbiológica do Bagaço e das Farinhas	- 59 -
11.3.	Caracterização Microbiológica dos Extratos	- 59 -
11.4.	Desenvolvimento do Novo Produto.....	- 60 -
11.5.	Metodologias microbiológicas aos iogurtes.....	- 65 -
11.6.	Caracterização Química dos iogurtes	- 67 -
V.	CONCLUSÕES	- 73 -
12.	Conclusões	- 74 -
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 76 -
VII.	ANEXOS	- 85 -
	Anexo 1- Massa de açúcar invertido Extraído de NP- 1420 de 1987.....	- 86 -
	Anexos 2 –Valor das massas m_1 e m_2 expressos em miligramas. Extraído da NP 704 de 1994	- 87 -
	Anexo 3- Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer -	88 -
	Anexo 4- Folha de prova sensorial utilizada nas provas realizadas.....	- 89 -

Índice de Figuras

Figura 1- Produção Mundial de maçã. Fonte: (http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E).....	- 5 -
Figura 2- Variedades de maçãs a) “Golden”; b) “Starking” c) “Reineta”. Fonte: (http://www.narcfrutas.com s.d.)	- 6 -
Figura 3- Fluxograma do processo industrial do fabrico de sumo de maçã. Adaptado (Streit 2004).....	- 8 -
Figura 4- Composição do bagaço de maçã. Adaptado (Kołodziejczyk et al., 2007)	- 9 -
Figura 5- Estrutura química básica dos compostos fenólicos. Fonte: (Alberti, 2014).....	- 15 -
Figura 6- Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico. Fonte: www.fitoquimicos.com	- 16 -
Figura 7- Exemplos de estruturas químicas de alguns dos compostos fenólicos da maçã e do bagaço de maçã. Adaptado de (Kalinowska et al., 2014).	- 17 -
Figura 8- Estrutura química dos flavonóides. Fonte: (Flambó, 2013).....	- 18 -
Figura 9- Radical DPPH•. Fonte: (Saito, 2007).....	- 21 -
Figura 10- Reação química da captura do radical ABTS ^{•+} . Fonte: (Borges et al., 2011).	- 21 -
Figura 11- Bagaço de maçã fresco	- 28 -
Figura 12- A) Bagaço de maçã secado; B) Farinha.....	- 28 -
Figura 13. - Balança de Halogénio.....	- 29 -
Figura 14- Condensador de refluxo e aquecimento em banho- maria usado na determinação da acidez.	- 30 -
Figura 15- Determinação dos açúcares redutores e totais. Complexo formado antes da titulação (castanho) e depois da titulação (branco).....	- 32 -
Figura 16- Mufla com cadinhos no seu interior.	- 33 -
Figura 17- Aparelho de Soxhlet, em funcionamento.....	- 34 -
Figura 18- Esquema da determinação da proteína, mineralização, destilação e titulação, antes e depois da viragem de cor (verde para rosa).....	- 36 -
Figura 19- Cadinhos filtrantes com resíduo solúvel e insolúvel. Precipitado formado das águas de lavagem.	- 37 -
Figura 20- Esquema simplificado da determinação das fibras dietéticas solúveis e insolúveis.	- 38 -
Figura 21- Esquema das repetições realizadas à extração aquosa.	- 40 -
Figura 22- Reta de calibração obtida com padrões de ácido gálico, utilizada na determinação dos compostos fenólicos.	- 41 -
Figura 23- Reta de calibração elaborada com padrões de Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.	- 42 -
Figura 24- Incubação dos iogurtes.....	- 45 -
Figura 25- Determinação dos açúcares totais dos iogurtes.....	- 47 -
Figura 26-Aparelho utilizado na determinação da fibra bruta (“Dosi-fiber”).....	- 48 -
Figura 27- Valores de acidez do bagaço de maçã e das farinhas em percentagem, na base seca, expresso em equivalentes de ácido málico.	- 53 -
Figura 28- Conteúdo em açúcares redutores e totais em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas.....	- 54 -
Figura 29-Valores de cinzas em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas.	- 55 -
Figura 30-Conteúdo em gordura expresso em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas. -	57 -

<i>Figura 31-Conteúdo de proteína bruta expressa em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas.....</i>	<i>- 58 -</i>
<i>Figura 32- Resultados obtidos da análise sensorial realizada aos iogurtes com incorporação de extrato aquoso (AQ_1h_100 °C) e etanólico (ET_2X4h_TA).....</i>	<i>- 61 -</i>
<i>Figura 33- Resultados obtidos da análise sensorial realizada com diferentes extratos aquosos (AQ_1h_100 °C e AQ_10_100°C).....</i>	<i>- 62 -</i>
<i>Figura 34- Gráfico representativo da atividade antioxidante dos iogurtes com incorporação dos vários extratos e do iogurte controlo.....</i>	<i>- 64 -</i>
<i>Figura 35- Representação gráfica da avaliação do crescimento das bactérias lácticas ao longo do fabrico dos iogurtes.....</i>	<i>- 65 -</i>
<i>Figura 36- Bactérias lácticas presentes nos iogurtes em estudo</i>	<i>- 66 -</i>
<i>Figura 37- Curva de crescimento de bactérias. Fonte (https:// web.fe.up.pt).....</i>	<i>- 67 -</i>
<i>Figura 38- Informação nutricional de iogurte natural comercial (Marca Danone).....</i>	<i>- 68 -</i>
<i>Figura 39- Composição nutricional de um iogurte com pedaços de fruto (Marca Activia).....</i>	<i>- 69 -</i>
<i>Figura 40- Resultados obtidos da análise sensorial realizada ao iogurte final com incorporação do extratos AQ_6x10,ao iogurte controlo e ao iogurte comercial.....</i>	<i>- 71 -</i>
<i>Figura 41- Preferência do painel de provadores perante os três iogurtes apresentados.....</i>	<i>- 72 -</i>

Índice de tabelas

<i>Tabela 1- Composição nutricional da maçã sem casca. Fonte: (www.insa.pt)</i>	- 8 -
<i>Tabela 2- Composição nutricional do bagaço de maçã. Valores expressos em massa seca. Adaptado: (Dhillona et al., 2012 e 2013) ; (Figuerola et al., 2005); (Joshi e Attri 2006); (Linskens e Jackson 1999); (Mahawara et al., 2012); (Macagnan et al., 2015); (Sudha et al., 2007).</i>	- 11 -
<i>Tabela 3- Exemplos de alimentos que possuem os diferentes tipos de fibra dietética. Fonte: (Mendes, 2011 , Santos, 2013)</i>	- 13 -
<i>Tabela 4- Fibras dietéticas presentes no bagaço de maçã. Fonte (Nawirska e Kwasniewska, 2005).</i>	- 14 -
<i>Tabela 5- Composição nutricional de um iogurte natural. Fonte: (www.insa.pt)</i>	- 26 -
<i>Tabela 6- - Evolução das formulações dos iogurtes</i>	- 45 -
<i>Tabela 7- Valores da percentagem de humidade do bagaço e das farinhas.</i>	- 52 -
<i>Tabela 8- Valores obtidos para o bagaço e farinhas quanto à presença de Mesófilos e Fungos.</i>	- 59 -
<i>Tabela 9-Avaliação da presença dos vários microrganismos nos extratos</i>	- 60 -
<i>Tabela 10- Valores de atividade antioxidante, para os diferentes extratos obtidos através do método ABTS</i>	- 63 -
<i>Tabela 11- Avaliação do crescimento das leveduras lácticas ao longo do fabrico dos iogurtes.</i>	- 65 -
<i>Tabela 12- Valores obtidos na caracterização química dos iogurtes e respetivo desvio padrão (DP).</i>	- 67 -
<i>Tabela 14- Tabela necessária para determinação de açúcares totais e redutores</i>	- 86 -
<i>Tabela 15- Massa de açúcar invertido (mg).</i>	- 87 -
<i>Tabela 16- Tabela com Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer. Fonte: Instituto Ricardo Jorge</i>	- 88 -

I. Introdução

1. Enquadramento Geral

Ao longo dos anos o desenvolvimento de alimentos funcionais têm vindo a evoluiu consideravelmente ao longo dos anos assim como a capacidade tecnológica para produzir um alimento com compostos fisiologicamente ativos tem crescido significativamente.

O interesse na nutrição e na prevenção de doenças está a provocar um maior interesse dos consumidores por alimentos de valor acrescentado ou alimentos funcionais, como por exemplo alimentos com níveis mais elevados de antioxidantes e fibras alimentares. É amplamente aceite que o aumento do consumo de frutos e vegetais possa reduzir o risco de cancro, doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (Rupasinghe et al., 2008).

Do ponto de vista económico e ambiental, o aproveitamento de subprodutos da indústria agroalimentar é sempre o mais desejável. Normalmente estes subprodutos são utilizados para alimentação animal, no entanto, são uma fonte de compostos bioativos e podem por isso ser usados para produzir produtos alimentares de valor acrescentado. Um exemplo disso é o subproduto proveniente dos cereais, onde encontramos uma fonte de fibra dietética. Os subprodutos da indústria transformadora de frutos também podem ser utilizados devido ao seu teor em compostos fenólicos, às suas propriedades antioxidantes e também devido à elevada quantidade em fibras. As proantocianidinas, por exemplo, podem ser obtidas a partir de um grande número de espécies de frutos e têm sido utilizadas para o enriquecimento de sumos de frutos, produtos à base de cereais, e de agentes dietéticos ou nutracêuticos, transformando-os em produtos funcionais antioxidantes com uma imagem muito positiva e elevada aceitação pelos consumidores (Aguedo et al., 2012).

O bagaço de maçã é um subproduto oriundo da indústria de produção de sumo de maçã e é uma fonte de fibra e compostos fenólicos. Alguns autores indicam que estes compostos, são os principais responsáveis pela atividade antioxidante. Estão presentes no bagaço de maçã, podendo transformar o bagaço numa fonte de antioxidantes facilmente disponível para o consumidor (Sudha et al., 2007).

Compostos fenólicos presentes em frutos têm demonstrado possuir propriedades anti-inflamatórias e antiproliferativas e a capacidade de prevenir uma variedade de doenças crónicas. As maçãs são uma fonte de compostos fenólicos, especialmente a casca, que é rica em muitos fitonutrientes, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos. Estudos evidenciam que os constituintes

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde.

da casca da maçã apresentam um maior efeito na inibição de HepG2 (carcinoma hepatocelular do fígado) do que a totalidade da maçã (Rupasinghe et al., 2008).

A incorporação de ingredientes bioativos, como fibra dietética (DF) e antioxidantes fenólicos em alimentos populares como o pão, tem crescido rapidamente, devido ao aumento da consciencialização do consumidor sobre a saúde (Sivam et al., 2010). Preparações de fibras podem ser utilizadas em alimentos como substitutos de farinha de pão, na preparação de biscoitos ou massas, podendo também ser adicionados a sopas, molhos, maionese, geleias, produtos lácticos, em carne processadas e bolos (Aguedo et al., 2012).

2. Objetivo

O objetivo principal deste trabalho foi a preparação de um alimento enriquecido com extratos do bagaço de maçã, contendo componentes e propriedades potencialmente benéficas para a saúde. Pretendeu-se ainda efetuar a valorização de subprodutos industriais, como o bagaço de maçã.

Para a concretização deste objetivos, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização química e microbiológica do bagaço de maçã
- Caracterização química e microbiológica das farinhas e dos extratos obtidos a partir do bagaço de maçã.
- Elaboração e avaliação de propriedades químicas, sensoriais e microbiológicas do novo alimento enriquecido com o extrato e caracterização do novo alimento enriquecido com o extrato.

II. Revisão Bibliográfica

3. Produção Mundial de Maçã e Valor Nutricional.

A maçã (*Malus domestica* L. Borkh) é uma das culturas de frutos mais populares do mundo. A sua produção mundial na última década aumentou em 38%, tendo atingido os 76 milhões de toneladas em 2012 e atualmente estimada em aproximadamente 84 milhões de toneladas/ano (Alberti 2014; Suarez et al., 2010). O maior produtor de maçãs no mundo é a China (52,0%), já o Canadá é o país com a menor percentagem de produção deste fruto (Figura 1).



Figura 1- Produção Mundial de maçã. Fonte: (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>)

Variedades de Maçãs

A forma silvestre da macieira (família das Rosáceas, sub-família das Pomóideas e género *Malus*) é originária da Ásia Central e Caucaso. Atualmente em todo o mundo existem mais de 4000 variedades de macieira e têm como origem as espécies *Malus communis* L. e *Malus permiler* M., agrupadas de acordo com vários parâmetros como o sabor, a forma ou a cor do seu fruto (Guiné, 2012). As diversas variedades possuem diferentes características organolépticas, aptidões culinárias e mesmo algumas diferenças no seu valor nutritivo e no teor em compostos benéficos para a saúde (Almeida et al., 2008).

O mercado mundial de maçãs é dominado por mais de 20 variedades, que são selecionadas pela sua resistência às doenças e aos frios inverniais, o seu aspeto (cor, forma), a sua textura e o seu elevado rendimento. Entre elas, cita-se a Bramley's Seedling, a Brayburn, a Cox's Orange Pippin, a Delicious, a Gala a Golden Delicious, a Discovery, a Granny Smith, a Jonathon a Newtown Pippin e a Starking (Guiné, 2012).

As variedades regionais são importantes para a preservação do património genético. Nos últimos anos tem se assistido a uma revalorização de algumas variedades, no quadro da diversificação e sofisticação do consumo de produtos agroalimentares (Simões et al., 2008).

O bagaço em estudo era constituído por três variedades regionais de maçã, nomeadamente a Golden, a Starking e a Reineta, (Figura 2).

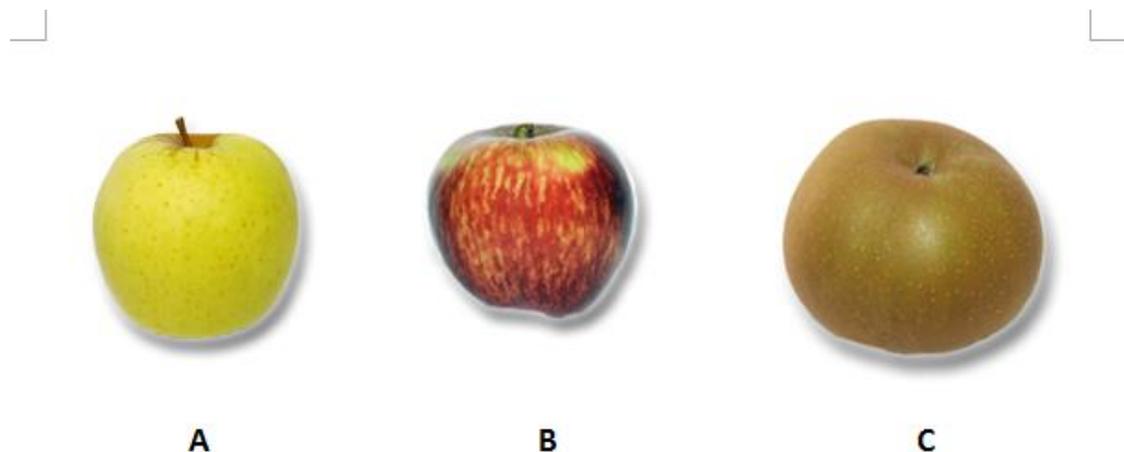


Figura 2- Variedades de maçãs a) “Golden”; b) “Starking” c) “Reineta”. Fonte: (<http://www.narcfrutas.com> s.d.)

A maçã de variedade Golden, originária dos E.U.A. (Virginia), é um fruto de forma predominante alongada, ovóide ligeiramente tronco-cónica e apresenta um pedúnculo comprido, fino e flexível. A sua superfície é de cor amarelo dourado no momento da maturação, pouco cerosa e sensível a carepa. Possui uma polpa fina, sumarenta, um pouco ácida e equilibrada, agradavelmente perfumada com muito boa qualidade (www.frusantos.com.; www.narcfrutas.com).

A variedade Starking também é proveniente dos E.U.A. (Lowa). Tem uma forma alongada, tronco-cónica, costada (5 lóbulos junto à fossa apical) irregular, apresenta um pedúnculo médio e inclinado. A sua superfície é de cor vermelha estriada em parte ou quase na totalidade do fruto. Tem como características uma polpa branca, fina, doce, pouco acidulada e perfumada. Apresenta uma qualidade alimentar crocante, firme, sumarenta e doce. Possui também grande qualidade gustativa, devido ao seu alto teor em aromas, vitaminas e minerais (www.frusantos.com; www.narcfrutas.com).

Por sua vez, a maçã Reineta é oriunda de França. É uma das variedades mais antigas e cultivadas neste país. A sua epiderme é rugosa e castanho-avermelhado. A sua polpa, apresenta um sabor doce com tendência a farinhação, e de coloração amarela. O pedúnculo é

curto e a forma achatada com contornos arredondados mas irregulares. É uma maçã muito utilizada para cozinha e como ingrediente em saladas (sem casca) (www.frusantos.com ; www.narcfrutas.com).

Composição e Valor Nutricional

A maçã é um fruto que permite “matar a fome” com menos calorias do que muitos outros alimentos (Almeida et al., 2008). Este fruto apresenta na sua composição uma elevada percentagem de água, a qual é o componente mais abundante nos frutos (mais de 80%). Possui apenas 57 kcal e contém também fibra alimentar na sua composição. É uma importante fonte de vitaminas, tais como as vitaminas A e C, e ainda as vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e B5 (niacina). Os minerais presentes nas maçãs são maioritariamente o magnésio e o cálcio. Os minerais presentes nas maçãs são maioritariamente o magnésio e o cálcio mas também se pode encontrar o potássio, o fósforo, o sódio, o cálcio, o magnésio, o enxofre, o cloro e o ferro. O conteúdo em sais minerais e vitaminas dependem dos fatores culturais, das variedades, do clima e do estado de maturação do fruto. Na constituição destes frutos ainda entram a glucose, frutose, sacarose, xilose, manose livre, celulose (presente nas paredes celulares), pectina, sorbitol, amido, ácido málico e alguns taninos (Guiné, 2012).

Na Tabela 1 encontram-se representados alguns dos componentes presentes nas maçãs, assim como as suas respetivas quantidades.

Além de ser importante em termos nutritivos, a maçã e os seus derivados são também uma boa fonte de compostos bioativos que possuem uma elevada capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos são conhecidos pelos seus benefícios para saúde humana e pela sua capacidade de diminuir os danos causados pelos radicais livres (Grigoras et al., 2013). O consumo regular de alimentos como a maçã pode ajudar na prevenção do desenvolvimento de algumas doenças crónicas como cancro e doenças cardiovasculares (Almeida et al., 2008; Moura et al., 2015).

Deve ainda realçar-se que, em geral, as fibras das maçãs possuem uma proporção equilibrada entre a fração solúvel e insolúvel. As fibras da maçã têm melhor qualidade do que outras fibras alimentares, devido à presença de compostos bioativos associados, tais como flavonóides, polifenóis e carotenóides (Figuerola et al., 2005).

Tabela 1- Composição nutricional da maçã sem casca. Fonte: (www.insa.pt)

Componente	Valor por 100g
Energia (kcal)	60
Água (g)	83,8
Proteína (g)	0,2
Gordura Total (g)	0,5
Cinza (g)	0,32
Hidratos de Carbono totais disponíveis (g)	12,7
Fibra Alimentar (g)	1,9
Vitamina A (µg)	4
Vitamina C (mg)	5
Vitamina B1 (mg)	0,02
Vitamina B2(mg)	0,03
Cálcio (g)	5
Ferro (g)	0,2
Magnésio (mg)	5
Colesterol (mg)	0
Caroteno (mg)	26

4. Bagaço de Maçã

O Bagaço de maçã é o principal subproduto obtido através da trituração e prensagem de maçãs durante o processo de fabrico industrial de sumo de maçãs (Figura 3).

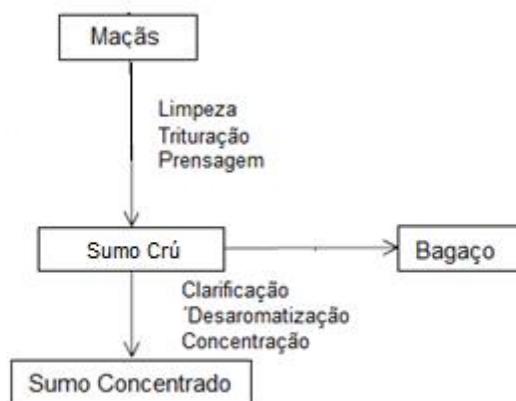


Figura 3- Fluxograma do processo industrial do fabrico de sumo de maçã. Adaptado (Streit 2004).

Este resíduo representa aproximadamente 30% dos frutos originais (Grigorias et al., 2013). Tal como se encontra representado na Figura 4, o bagaço de maçã é constituído por

uma mistura de vários componentes da maçã, onde a polpa representa aproximadamente mais de metade da sua composição. A casca é o segundo componente em maior quantidade com cerca de 30%, seguida das sementes com menos de 10% da composição total do bagaço. Os dois componentes com menor percentagem presente no bagaço de maçã são os carpelos e por último os pedúnculos.

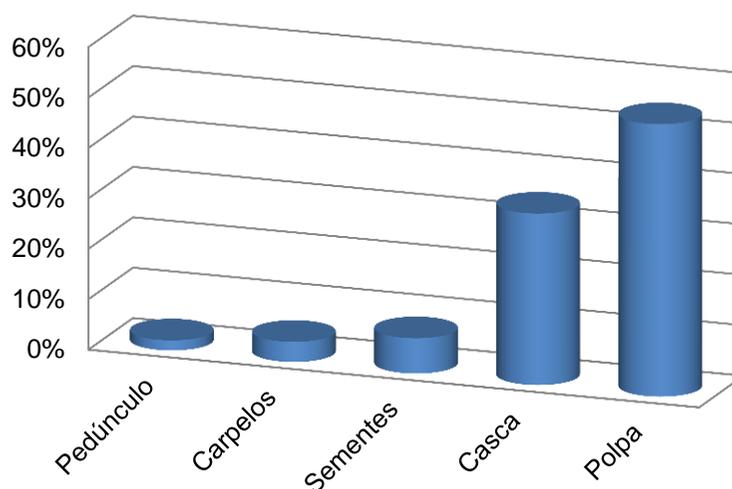


Figura 4- Composição do bagaço de maçã. Adaptado (Kołodziejczyk et al., 2007)

Note-se que os resíduos originados do esmagamento dos frutos e legumes durante o processo de fabrico de sumos podem conter muitos nutrientes, uma vez que as maiores quantidades de vitaminas e sais minerais de muitos alimentos se encontram nas suas cascas (Grigoras, et al. 2013). Neste contexto, estudos têm sido realizados no sentido de encontrar novas formas de reutilizar estes resíduos originados durante o processamento de alimentos, e que atualmente representa um dos problemas que as indústrias agroalimentares enfrentam, uma vez que, têm que saber gerir grandes volumes de resíduos produzidos diariamente (Grigoras, et al. 2013).

A reutilização mais comum deste resíduo na sua forma húmida é como alimento para animais ou como fertilizante. Outras formas encontradas tem sido, a incorporação deste subproduto em alimentos com a finalidade de desenvolver novos produtos com qualidade atrativa ao consumidor e deste modo auxiliar também no impacto ambiental (Gonçalves e Leão,2013).

O bagaço de maçã pode ser avaliado de acordo com os compostos que se encontram inicialmente presentes no fruto e que permanecerão no bagaço após a etapa de prensagem a frio (Grigoras et al., 2013).

4.1. Propriedades Nutricionais

O bagaço de maçã pode ser considerado como um ingrediente alimentar rico em nutrientes devido à sua composição nutricional (Sudha, 2011). É constituído basicamente por sumos remanescentes com açúcares e outras substâncias solúveis, hidratos de carbono insolúveis, pequenas quantidades de proteína e minerais (Protzek et al.,1998).

Analisando a Tabela 2 onde se encontra representada a composição nutricional do bagaço de maçã verifica-se que este subproduto é constituído na sua maioria por água podendo conter até 80% da sua composição. Uma das consequências do elevado teor em humidade é torná-lo suscetível à deteriorização microbiológica (Protzek et al.,1998). Contém também uma quantidade significativa de açúcares totais 10,8-15%, o teor em proteína pode variar entre 2,9-5,7%. Os valores de gordura encontram-se entre 0,26 a 0,50% em base seca. Relativamente ao teor de cinzas variam entre 0,23 e 1,14 % também expresso em base seca. O bagaço de maçã contém entre 2,5 a 3,3% de acidez expressa em % ácido málico. Quanto ao seu teor em fibra dietética verifica-se que é um alimento com uma elevada quantidade, contendo entre 60,7 a 89,8%, sendo que a fibra maioritariamente presente é a insolúvel (56,5-81,6%). (Figuerola et al., 2005; Sudha, 2007)

O bagaço de maçã pode ser considerado um potencial ingrediente para produtos alimentares, devido à sua proporção equilibrada de fracções solúveis e insolúveis de fibra dietética, e também à presença de compostos bioativos, como os polifenóis, flavonóides e carotenos (Sudha, 2011).

As propriedades funcionais do bagaço de maçã destacam-se pela presença de pectina, e consequentemente, decréscimo no risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Gonçalves e Leão, 2013).

Tabela 2- Composição nutricional do bagaço de maçã. Valores expressos em massa seca. Adaptado: (Dhillona et al., 2012 e 2013) ; (Figuerola et al., 2005); (Joshi e Attri 2006); (Linskens e Jackson 1999); (Mahawara et al., 2012); (Macagnan et al., 2015); (Sudha et al., 2007).

Componentes	(%)
Humidade	66,4 – 80
Açúcares totais	10,8 – 15,0
Cinza	0,23 – 1,14
Proteína	2,9-5,7
Acidez (% ácido málico)	2,5 – 3,3
Matéria Gorda	0,26- 0,50
Fibra dietética total	60,7-89,8
Fibra dietética insolúvel	56,5- 81,6
Fibra dietética solúvel	4,1-14,6

4.2. Fibra Dietética

As fibras dietéticas são definidas hoje em dia pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) como " os polissacarídeos e restos de materiais vegetais que são resistentes à hidrólise (digestão) pelas enzimas digestivas humanas ". Esta definição inclui polissacarídeos não amiláceos, amido resistente, lenhina e componentes menores, tais como ceras, cutina e suberina, e foi adotado por muitos países europeus (Colin-Henrion et al., 2009). Os constituintes da fibra alimentar são, na sua maior parte, substâncias de origem vegetal, predominantemente oriundas da parede celular e em menor quantidade alguns polissacarídeos provenientes de outras partes das plantas ou sintetizados por microrganismos (Mendes, 2011).

Em termos químicos, a definição de fibra dietética refere-se essencialmente à soma de polissacarídeos não amiláceos e de lenhina. Existem no entanto alguns componentes não-estruturais, tais como as gomas e mucilagens, e aditivos industriais como a celulose modificada, pectina modificada, gomas comerciais e polissacarídeos de algas. Estes compostos não são biologicamente ativos como, por exemplo, vitaminas ou componentes minerais, que podem ter a capacidade de afectar o metabolismo e processos fisiológicos que ocorrem no organismo humano (Nawirska e Kwasniewska, 2005). As gomas e mucilagens pertencem aos hidrocolóides que compreendem uma ampla gama de polissacarídeos viscosos. Estas substâncias são derivadas de exsudatos vegetais (goma arábica), sementes (gomas de guar e *alfarroba*) e de

extractos de algas marinhas (agar, carragena e alginatos). As mucilagens estão presentes em células das camadas externas de sementes da família “plantain”, por exemplo, *isphagula* (*Psyllium*). Estes hidrocolóides são utilizados em certos alimentos, em pequenas quantidades, como agentes gelificantes, espessantes, estabilizantes e emulsificantes (Mendes, 2011).

A fibra alimentar está presente na dieta humana através do consumo de alimentos de origem vegetal, nos quais se encontram normalmente como constituinte natural ou em alimentos onde tenha sido adicionada na forma de suplementos alimentares ricos em fibra (Mendes, 2011).

É geralmente reconhecido que a fibra dietética é uma parte essencial na dieta humana. Na sociedade ocidental, a ingestão diária de fibra dietética é consideravelmente menor do que a dose recomendada pela Organização Mundial de Saúde, isto é de 14,1 g / 1000 kcal. Na prática, isso significa que uma dose diária aconselhável é cerca de 35 g para um homem e 28 g para uma mulher (Brunt e Sanders, 2013).

Tipos de Fibras e Principais Funções

As fibras podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, a sua solubilidade em água e em relação ao seu grau de fermentação (Mendes, 2011). As cadeias laterais ou ramificações da estrutura básica e o grau de polimerização, quando presentes, são responsáveis pela solubilidade das fibras alimentares, que podem ser divididas em: fibras dietéticas solúveis (FDS) e fibras dietéticas insolúveis (FDI), conjunto que constitui a fibra dietética total (FDT) (Santos, 2013).

A fibra dietética insolúvel é hidrofóbica, pouco fermentável e formam misturas de baixa viscosidade. Representa a principal fração (75%) de fibra da grande maioria dos alimentos, sendo também a única, ou quase a única, em alguns alimentos. Compõe-se principalmente de constituintes da parede celular das células vegetais, que incluem a celulose, hemiceluloses e lenhina, esta é a mais hidrofóbica de todas e também a que se encontra em menor quantidade na dieta humana (Mendes, 2011; Momm, 2007), têm como principal função regular o tempo de permanência e o trânsito intestinal no organismo, o que se deve ao facto de absorverem água ajudando ao funcionamento do intestino e protegendo-o (Santos, 2013).

Por outro lado a fibra dietética solúvel representa aproximadamente um terço das fibras dietéticas totais ingeridas com a dieta típica. É constituída por polissacarídeos não-celulósicos, tais como pectinas, gomas, mucilagens, inulina e frutanas. A maior parte das fibras solúveis são polímeros de cadeia longa, que se dissolvem ou dispersam formando um gel na presença de água, sendo também conhecidos como hidrocolóides. Por esta razão, retardam o esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito intestinal, e diminuem o ritmo de absorção de glucose e colesterol.

Na sua maioria, estas fibras sofrem degradação/fermentação no intestino grosso. Como consequência da sua fermentação bacteriana resultam gases como hidrogénio, metano e dióxido de carbono e ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), que são importantes para o metabolismo intestinal.

Tabela 3- Exemplos de alimentos que possuem os diferentes tipos de fibra dietética. Fonte: (Mendes, 2011 ,Santos, 2013)

Fibra Dietética Solúvel	Frutos (maçãs, peras, laranjas, bananas), verduras (cenouras, couve-flor), aveia, cevada, leguminosas (feijão, grão de bico, lentilhas, ervilhas, soja) arroz, centeio e milho
Fibra Diética Insolúvel	Farelo de cereais, grãos integrais de cereais, frutos secos, frutos com casca e verduras.

A maçã tem sido extensivamente estudada, uma vez que é um fruto largamente consumido e é também uma interessante fonte de fibras dietéticas, quer insolúveis (celulose e algumas xiloglucanas) quer solúveis (principalmente polissacarídeos pécticos), estando ambas na sua maioria relacionadas com a parede celular (Colin-Henrion et al., 2009).

São conhecidas algumas informações sobre o conteúdo de fibra dietética existente na maçã e em produtos alimentares industriais baseados em maçã. A casca, (epiderme) e as zonas centrais (carpelos) contêm uma maior proporção de parede celular do que o mesocarpo. Além disso, a concentração e o tipo de polissacarídeos diferem de um tecido para outro, sendo os carpelos ricos em glucanas e xiloglucanas, e o mesocarpo contém uma elevada proporção de componentes pécticas. Finalmente, a casca e as sementes parecem ser ricas em material insolúvel não-polissacarídeo (respetivamente, ceras e lenhina). No entanto, o processamento de frutos que envolve muitas vezes operações de descasque que podem, assim, ser prejudiciais para o teor de fibra, uma vez que, processos como o aquecimento têm demonstrado desencadear efeitos degradativos sobre os polissacarídeos pécticos (Colin-Henrion et al., 2009). Na tabela 4 encontram-se representadas as percentagens de fibras dietéticas existentes no bagaço de maçã.

Tabela 4- Fibras dietéticas presentes no bagaço de maçã. Fonte (Nawirska e Kwasniewska, 2005).

Tipo de Fibra	Porcentagem (%)
Pectina	11,7
Hemiceluloses	24,4
Celulose	43,6
Lenhina	20,4

Benefício da Fibra Dietética para a Saúde

As fibras dietéticas têm ocupado uma posição de destaque devido aos resultados divulgados em estudos científicos, os quais demonstram a sua acção benéfica no organismo e a relação entre a ingestão em quantidades adequadas e a prevenção de doenças. Este facto demonstra como estas são essenciais à saúde (Santos, 2013).

A fibra dietética oferece uma variedade de benefícios para a saúde. A fibra solúvel é conhecida pelo seu efeito hipocolesterolemizante e a fibra insolúvel pela redução do risco de cancro do cólon. A β -glucana é responsável pela redução do risco de cancro do cólon e também por reduzir a absorção de glucose no sistema digestivo. Ingredientes ricos em fibras apresentam muitas propriedades que influenciam as funções fisiológicas de alimentos (Sudha et al., 2007).

O consumo regular de fibras alimentares tem sido uma das mais constantes recomendações feitas por nutricionistas e órgãos oficiais. Estas recomendações são baseadas na constatação de que as fibras dietéticas apresentam efeitos fisiológicos que são responsáveis por alterações significativas nas funções gastrointestinais humanas. As propriedades fisiológicas das fibras dietéticas estão relacionadas com o tipo de açúcar que as constitui, que podendo ser o mesmo pode conferir propriedades diferentes devido às ligações estruturais serem diferentes, e desta forma possuem características distintas, ou seja algumas fibras são responsáveis pelo aumento da massa fecal não apresentando nenhuma acção na diminuição do colesterol ou da glucose do sangue. Portanto, para que uma dieta seja rica em fibras é necessário que haja um consumo equilibrado entre fibras solúveis e insolúveis (Protzek et al., 1998)

4.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas derivados da fenilalanina e tirosina. São substâncias que apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilos, o que os torna diferentes na estrutura química e reatividade (Alberti, 2014).

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos em produtos naturais no reino vegetal. Mais de 8000 estruturas fenólicas são actualmente conhecidas (Tsao, 2010). De acordo com a maioria dos autores os compostos fenólicos podem ser divididos em não flavonóides e flavonóides. Os ácidos fenólicos fazem parte do grupo dos não flavonóides e podem dividir-se em ácidos benzóicos e cinâmicos. Os flavonóides subdividem-se em antocianinas, taninos e flavonóis (Côrte - Real, 2009).

Frutos, legumes, grãos integrais e outros tipos de alimentos e bebidas, como chá, chocolate e vinho são fontes de compostos fenólicos. A ampla distribuição e a diversidade de polifenóis em plantas levaram a diferentes formas de categorizar esses compostos que ocorrem naturalmente. Os polifenóis foram classificados tendo em conta a sua origem, a sua função biológica e estrutura química. Além disso, a maioria dos polifenóis em plantas existe na forma de glicósidos com diferentes unidades de açúcar e açúcares acetilados em diferentes posições das estruturas de polifenóis (Tsao, 2010).

Os compostos fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres e agentes quelantes de iões metálicos que são capazes de catalisar a oxidação de lípidos. A capacidade dos compostos fenólicos para actuar como antioxidantes depende da sua estrutura, estando entre os antioxidantes mais potentes os flavonóides (Lobo et al., 2009). A Figura 5 ilustra a estrutura química básica dos compostos fenólicos.

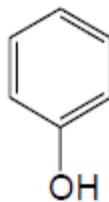


Figura 5- Estrutura química básica dos compostos fenólicos. Fonte: (Alberti, 2014)

4.3.1. Maçãs e Compostos Fenólicos.

A composição dos compostos fenólicos nos frutos depende entre outros fatores, da variedade, embora diferentes quantidades possam ocorrer dependendo do grau de maturação (Alberti, 2014). As principais fontes de compostos fenólicos são frutos cítricos, como limão, laranja, além de outros frutos como maçã, pêra, mamão, uva e cereja (Ferrandin, 2014). Uma maçã (100 g) apresenta uma atividade antioxidante semelhante a 1,5 g de vitamina C (Kalinowska et al., 2014).

De entre os componentes contidos na maçã, os compostos fenólicos são os mais estudados nos últimos anos e são bem conhecidos pelos seus efeitos benéficos para a saúde humana e pela sua capacidade de diminuição dos danos do stress oxidativo devido a espécies radicais (Grigoras et al., 2013). Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante destes frutos. As maçãs com maior conteúdo em compostos fenólicos tendem a possuir uma maior atividade antioxidante (Kalinowska et al., 2014). No entanto, a maçã contém também terpenóides, sendo estes menos estudados na maçã que os polifenóis. Estes compostos têm muitas propriedades interessantes, tais como anti-inflamatórias, anti-microbianas, antimicóticas, antioxidante, protetora do fígado, antiviral, imunomodulador, hemolítica ou efeitos citostáticos (Grigoras et al., 2013).

As principais classes de compostos fenólicos encontrados nas maçãs são os ácidos fenólicos e os flavonóides (Alberti, 2014)

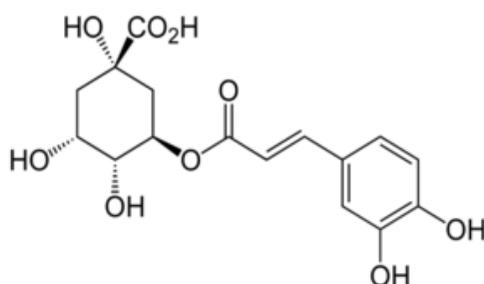


Figura 6- Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico. Fonte: www.fitoquimicos.com

O ácido 5-cafeoilquínico, é um dos ácidos clorogénicos (Figura 6) e é o principal ácido fenólicos presente na maçã, representando entre 87 a 79% desta classe na epiderme, centro e sementes (Alberti, 2014).

O teor de compostos fenólicos no epicarpo, mesocarpo, endocarpo e sementes de maçãs em muitas variedades de maçãs está entre 1 g e 6 g/kg de fruto fresco, mas em algumas cultivares pode chegar a 10 g/kg de fruto fresco (Gorinstein et al., 2001).

Na Figura 7 encontram-se representadas as estruturas químicas de alguns dos compostos fenólicos presentes quer nas maçãs quer no bagaço de maçã nomeadamente o ácido hidroxibenzóico, o ácido hidroxicinâmico, quercetina, floridina, cianidina, catequina e procianidina (Dhillon et al., 2013).

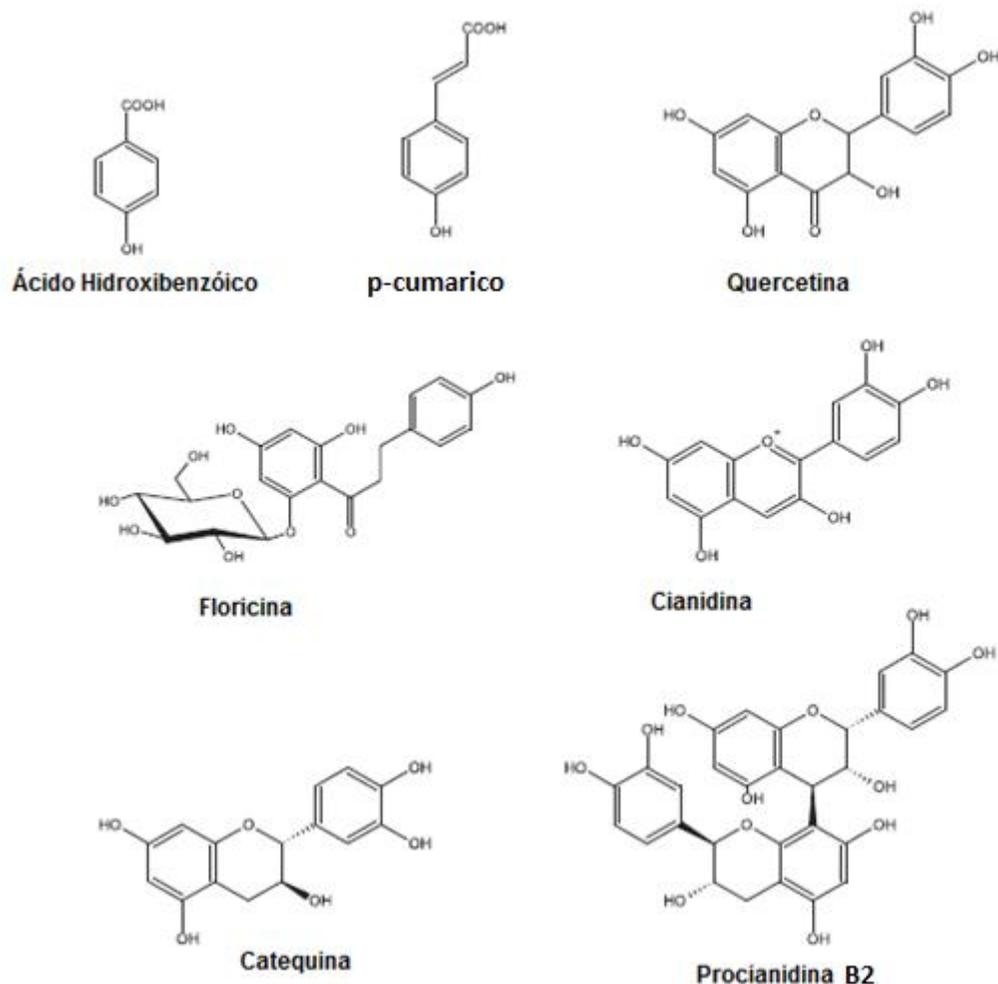


Figura 7- Exemplos de estruturas químicas de alguns dos compostos fenólicos da maçã e do bagaço de maçã. Adaptado de (Kalinowska et al., 2014).

4.3.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são o segundo grupo mais importante de fitoquímicos. Quimicamente possuem o grupo funcional dos ácidos carboxílicos. Encontram-se divididos em dois grupos com estruturas diferentes, o ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico, com uma estrutura básica C1-C6 e C3-C6, respetivamente (Ferrandin, 2014; Tsao, 2010).

Os frutos e os vegetais contêm muitos ácidos fenólicos na sua forma livre, já os grãos e as sementes (particularmente o farelo) possuem muitas vezes os ácidos fenólicos na forma glicosilada. Estes ácidos fenólicos só podem ser libertados por hidrólise ácida ou alcalina, ou por enzimas (Tsao, 2010).

O segundo grupo são os derivados do ácido cinâmico, com nove átomos de carbono, está presente em quantidades significativas em maçãs, sendo os mais comuns os ácidos *p*-cumárico e o cafeico. Esses dois compostos, geralmente, estão na forma esterificada com o ácido quínico, formando os ácidos *p*-cumaroilquínico e o ácido 5-cafeoilquínico, respectivamente (Alberti,

2014). Os ácidos hidroxicinâmicos são importantes substratos para a polifenoloxidase. Os seus produtos de condensação e oxidação não somente contribuem para a formação de pigmentos castanhos (melanoidinas) em maçãs, mas também aumentam a oxidação de outros compostos fenólicos, como os flavan-3-óis, por mecanismo acoplado (Alberti, 2014).

4.3.3. Flavonóides

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos nas plantas. São polifenóis que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal. São responsáveis pela coloração das flores e frutos em plantas superiores, e são comuns em dietas no mundo inteiro, uma vez que se encontram amplamente distribuídos em plantas, frutos, legumes e em várias bebidas e representam componentes substanciais da parte não-energética da dieta humana (Ferrandin, 2014; Martínez-Flórez et al., 2002).

O termo "flavonóides" é geralmente utilizado para descrever uma vasta gama de moléculas que incluem uma estrutura de átomos de carbono C6-C3-C6, ou mais especificamente uma funcionalidade fenil benzopirano. Devido ao padrão de hidroxilação e variações no anel de cromano (Anel C), os flavonóides podem ser ainda divididos em diferentes sub-grupos, tais como antocianinas, flavan-3-óis, flavonas, flavanonas e flavonóis. Embora a grande maioria dos flavonóides tem o seu anel B ligado à posição C2 do Anel C, alguns flavonóides, tais como isoflavonas e neoflavonóides, cujo anel B está ligado na posição C3 e C4 do anel C, respectivamente, são também encontrados em plantas (Marais et al., 2008 ; Tsao 2010). Na Figura 8 encontra-se representada a estrutura química dos flavonóides.

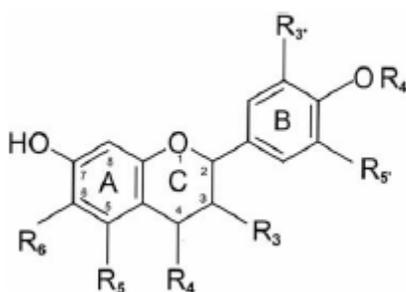


Figura 8- Estrutura química dos flavonóides. Fonte: (Flambó, 2013)

Em termos de funcionalidade os flavonóides apresentam uma série de propriedades farmacológicas que lhes permite atuar em sistemas biológicos e assim favorecer a saúde humana, devido à atividade antioxidante que apresentam. Os flavonóides são compostos

relativamente estáveis, pois podem resistir à oxidação, temperaturas elevadas e variações de acidez (Flambó, 2013).

Os flavonóides protegem o organismo contra os danos produzidos por agentes oxidantes, como os raios ultravioletas, a poluição ambiental e substâncias químicas presentes nos alimentos. O organismo humano não pode produzir estas substâncias tendo estas de ser obtidas através da alimentação ou na forma de suplementos (Martínez-Flórez et al., 2002).

4.4. Atividade antioxidante

O crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutos, vegetais, cereais e dos seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e em compostos fenólicos e têm demonstrado atividade antioxidante eficaz em sistemas modelos (Soares et al., 2008).

As maçãs contêm vários compostos fenólicos antioxidantes, como a procianidina, a catequina, a epicatequina, o ácido clorogénico, a floridina, a quercetina entre outros. Os polifenóis são os principais compostos responsáveis pela capacidade antioxidante total de maçãs (Wegrzyn et al., 2008). Alguns extratos preparados a partir de maçã têm demonstrado uma elevada atividade antioxidante e atividade antiproliferativa contra células cancerosas humanas (Suarez et al., 2010).

Vários estudos têm sido realizados para quantificar a atividade antioxidante da maçã. A estimativa de capacidade antioxidante de alimentos e bebidas tem sido realizada por vários métodos com base em diferentes mecanismos de reacção. Dentre eles, aqueles que envolvem radicais estáveis, tais como 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS^{•+}) são dois dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de uma grande diversidade de alimentos e bebidas (Lobo et al., 2009).

Moo-Huchin et al., (2015) investigou a atividade antioxidante de um extrato de maçã usando uma mistura de três solventes (acetona /água/ ácido acético, na proporção (70:29,5:0,5) v/v/v)) e utilizou dois métodos, o método ABTS e o método DPPH para a quantificar. Obteve valores de atividade antioxidante de $33,1 \pm 0,32 \mu\text{M TE}$ (Equivalentes Trolox) / g massa seca para o método ABTS e $16,8 \pm 75,8 \mu\text{M TE}$ / g massa seca, para o método DPPH.

Também Soares et al., (2008) analisou a atividade antioxidante de um extrato de maçã realizado com uma mistura de solvente (acetona e água) na proporção (75:15)(v/v) e obteve

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

valores de atividade antioxidante para o método ABTS de 4,83 $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra (base húmida). Para o método DPPH foram obtidos 7,43 $\mu\text{mol TE/g}$ amostra (base húmida).

A capacidade antioxidante do bagaço de maçã está relacionada com o seu perfil fenólico. As procianidinas têm sido reconhecidas como o principal contribuinte para a atividade antioxidante das maçãs e derivados, sendo a sua capacidade antioxidante dependente do seu grau de polimerização e substituintes (Garcia et al., 2009).

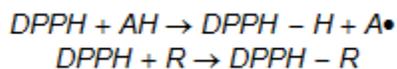
Metodologias para avaliar a atividade antioxidante.

O método DPPH e o método ABTS são os dois métodos mais utilizados para quantificar a atividade antioxidante em alimentos ou bebidas. No entanto, estes métodos diferem em vários aspetos, entre os quais a forma de produção de radicais livres, bem como na forma de deteção da atividade sequestradora dos radicais (Gonçalves e Lemos, 2012).

O método DPPH consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH •). O radical DPPH • (Figura 9) possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Na presença de uma substância capaz de lhe doar um átomo de hidrogénio, o DPPH transforma-se na sua forma reduzida (DPPH-H) perdendo a cor violeta da solução original (Borges et al., 2011, Gonçalves e Lemos, 2012). Este método apresenta-se de uma forma simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas e quitosanas, no entanto por ser um método colorimétrico não é muito aplicado para substâncias coloridas devido a interferências por pigmentos (Borges et al., 2011).

A reação do radical livre DPPH • na presença de um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R.) ocorre de acordo com Equação 1.

Equação 1- Reação química do radical DPPH• com um antioxidante (AH). Fonte: (Brand-Williams et al., 1995)



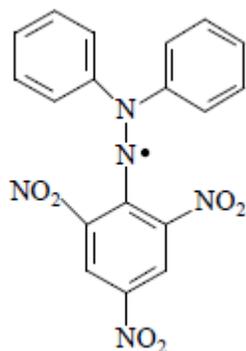


Figura 9- Radical DPPH •. Fonte: (Saito, 2007)

Outro método muito utilizado na determinação da atividade antioxidante é o método ABTS. Este método mede a atividade antioxidante através da captura do radical $ABTS^{*+}$, que pode ser gerado através de uma reação química, electroquímica ou enzimática (Figura 10) (Borges, et al. 2011). A atividade antioxidante determinada a partir deste método pode ser expressa em equivalentes de trolox.

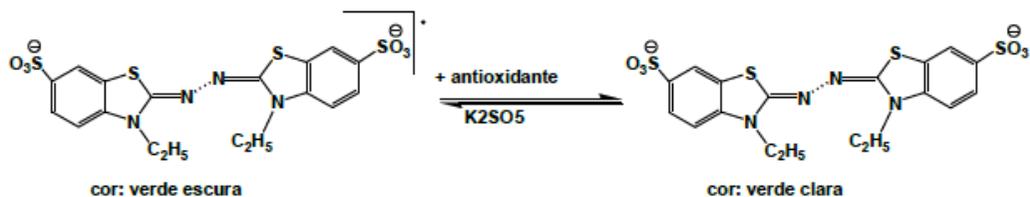


Figura 10- Reação química da captura do radical $ABTS^{*+}$. Fonte: (Borges et al., 2011).

O método de ABTS pode ser realizado em meios aquosos e orgânicos e numa ampla gama de valores de pH, estima com precisão a capacidade antioxidante dos alimentos, em particular para aquelas que contêm compostos hidrofílicos, lipofílicos e altamente pigmentados (Magalhães et al., 2014). Neste método, as interferências de amostras coloridas são menores comparativamente ao método DPPH (Magalhães et al., 2014).

O principal problema na aplicação do método ABTS é os diferentes protocolos analíticos disponíveis, oferecendo diferentes escolhas em relação ao padrão utilizado (Trolox, ácido ascórbico ou ácido gálico) e também no tempo de reação aplicadas. Esta situação dificulta a comparação de dados entre categorias de alimentos e de diferentes autores (Magalhães et al., 2014).

5. Alimentos Funcionais

As indústrias alimentares têm grandes expectativas para que os seus produtos atendam à procura dos consumidores por um estilo de vida mais saudável. Neste contexto, o alimento funcional desempenha um papel específico. Estes alimentos não visam somente saciar a fome ou prover os nutrientes necessários, mas também prevenir doenças e aumentar o bem-estar físico e mental dos consumidores (Coelho e Wosiack, 2010; Menrad, 2003).

Alimentos funcionais ou nutracêuticos são termos utilizados para caracterizar alimentos e/ou ingredientes alimentares que, além das suas funções nutricionais normais (fonte de energia e substrato para a formação de células e tecidos), possuem, na sua composição, uma ou mais substâncias capazes de atuar como moduladores dos processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar e prevenindo o surgimento precoce de doenças degenerativas (Coelho e Wosiack, 2010).

Os alimentos funcionais representam uma união da farmacologia com a tecnologia alimentar na busca de uma melhor qualidade de vida, baseada na alimentação. Isso tem sido reconhecido pelo consumidor, que tem procurado com mais frequência este tipo de produtos nas prateleiras dos supermercados. Estes alimentos não podem ser encarados como uma solução, mas sim, como um auxílio que os avanços tecnológicos e científicos nos colocam à disposição (Coelho e Wosiack, 2010).

O interesse em alimentos ricos em fibra alimentar e antioxidantes, aumentou nas últimas décadas e a importância destes componentes nos alimentos levou ao desenvolvimento de um grande mercado de ingredientes e produtos ricos em antioxidantes e fibras (Ajila et al., 2008).

Várias investigações têm sido realizadas com o objetivo de verificar a utilidade de variados subprodutos de indústrias agroalimentares para posterior incorporação em alimentos com propriedades nutricionais fornecidas por estes.

Staffolo et al., (2004) realizaram estudos para verificar os efeitos de diversas fibras alimentares (maçã, trigo, bambu e inulina) sobre as propriedades sensoriais e reológicas de iogurtes enriquecidos com as fibras alimentares. Os resultados obtidos dos iogurtes com as diversas fibras foram satisfatórios. Apenas o iogurte com fibra de maçã mostrou diferenças de cor em relação ao iogurte controle. Relativamente à sua análise sensorial, apesar de as fibras modificarem as características reológicas, (menores valores de compressão máxima no caso dos iogurtes fortificados com as fibras de maçã) o painel de provadores premiou os iogurtes fortificados com elevadas pontuações indicado uma boa aceitabilidade.

Também Vitali et al., (2009) com o objetivo de desenvolver biscoitos nutricionalmente e funcionalmente melhorados, criou uma receita baseada em farinha de trigo suplementada com inulina (Raftilin) (10,5%) juntamente com farinha de soja, amaranto, alfarroba (24,5%), e fibras de maçã ou fibra de aveia (16,5%). Quando analisados os diversos parâmetros nutricionais verificou-se que a suplementação com as diferentes variedades de farinhas provocou um aumento em alguns dos parâmetros nutricionais, tais como, no teor de proteína, e no teor total de fibra dietética, ocorreu uma melhoria no conteúdo fenólicos total e também na atividade antioxidante quando se efetuou a incorporação de alfarroba e de fibras maçã.

Protzek et al., (1998) investigaram o aproveitamento do bagaço de maçã na produção de biscoitos ricos em fibras. Foi produzida uma farinha de bagaço de maçã e caracterizaram-na em diversos parâmetros (químicos, físicos e microbiológicos) e posteriormente foram elaborados biscoitos com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo pela farinha de bagaço de maçã. Os biscoitos obtiveram uma boa aceitação a nível sensorial e em termos químicos verificou-se que continham um elevado teor de fibras alimentares (66,03%).

6. Iogurtes

6.1. Descrição evolutiva histórica

O iogurte é o mais antigo produto lácteo fermentado, pensando-se que tenha surgido no período do Neolítico, durante o qual, os pastores começaram a domesticar animais mamíferos e a utilizar o seu leite como alimento (Santos, 2011). Tudo indica que os primeiros animais domesticados tenham sido os camelos, búfalos, cabras, ovelhas ou vacas. O leite destes animais era armazenado em marmitas de barro à temperatura ambiente, o que, conjugado com o clima do deserto com temperaturas que chegavam a atingir os 43 °C, se criavam as condições ideais para que o leite fermentasse, produzindo um tipo de iogurte rudimentar. O termo iogurte é derivado da palavra “jugurt”, sendo este um alimento com importância significativa na Europa Oriental (Turquia, Bulgária, Grécia, Roménia) e Arábia. Os primeiros iogurtes comerciais foram produzidos em França e Espanha em 1920 e nos Estados Unidos em 1940 (Santos, 2011).

O iogurte é um produto resultante da fermentação láctica, está presente na dieta alimentar humana desde os tempos remotos, quando a fermentação era utilizada como forma de preservação do leite (Rodas et al., 2001). É um dos produtos lácteos que deverá continuar a aumentar as suas vendas devido à diversificação da gama de produtos, incluindo iogurtes magros, iogurtes probióticos, batidos de iogurte, iogurtes líquidos, gelado de iogurte, entre outros (Staffolo et al., 2004)

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, “iogurte é um leite coagulado obtido por fermentação láctica, através da adição de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* ao leite, pasteurizado ou concentrado, com ou sem aditivos opcionais. Os microrganismos no produto final precisam ser viáveis e abundantes”. A fermentação do leite deve ser feita procurando equilibrar o crescimento de ambas as bactérias, de modo a se obter um produto suficientemente ácido e aromático (www.setor1.com.br/laticinios/iogurtes/).

6.2. Processo Produtivo do iogurte

As etapas de produção do iogurte incluem, de modo geral, seis etapas, a verificação das características do leite original, a padronização do teor de gordura, o tratamento térmico, a adição das bactérias, a incubação e a embalagem do produto final (Neto et al., 2005).

O primeiro objetivo na recepção do leite é eliminar todos os contaminantes, de modo a obter um produto final de qualidade elevada. A recepção do leite dos caminhões tanque é feita com filtros de linha simples e sob refrigeração para evitar o desenvolvimento de microrganismos contaminantes (Santos, 2011).

É necessário verificar as características do leite para tal é realizado um tratamento prévio ao leite. O tratamento térmico promove: o desenvolvimento das culturas lácticas selecionadas devido à eliminação de microrganismos competidores por substrato; a expulsão de oxigênio do leite, intensificando a atividade das bactérias lácticas; a desnaturação das proteínas do soro que interagem com a caseína, deixando-a livre para a coagulação. Este processo pode realizar-se a 85 °C durante 30 minutos ou a 95 °C por 10 minutos (Mathias, 2011; Santos, 2011).

De seguida, o leite é normalizado em teor de matéria gorda, com adição de nata. Quanto ao teor proteico, adicionam-se concentrados proteicos (proteína de soro), ou leite em pó magro de forma a aumentar o extrato seco. Adicionam-se ainda substâncias edulcorantes (máximo 11%) (Santos, 2011).

Posteriormente são adicionadas as bactérias necessárias para intervir na fermentação. As bactérias são *Streptococcus salivarius spp thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* e devem ser adicionadas em temperaturas ótimas, entre 40-45 °C. Estas bactérias provocam um abaixamento do pH inicial até 5,0 e 4,0 respetivamente (Fujihara et al., 2014; Santos, 2011).

Por fim realiza-se a incubação. Nesta etapa ocorre transformação da lactose em ácido láctico, deve efetuar-se a 43 °C, durante 4 a 6 horas, sem agitação, é um processo biológico que deve ser controlado ao máximo. Após a incubação é feito o arrefecimento, que por sua vez tem

a finalidade de parar a fermentação. Recomenda-se que a temperatura final do iogurte não seja superior a 5 °C, para que mantenha suas características sensoriais, químicas, físico-químicas e biológicas (Fujihara et al., 2014; Santos, 2011).

Por fim, processa-se a embalagem em copos de plástico ou vidro e o correspondente armazenamento a 5 °C durante 24 horas, para estabilização da estrutura. O iogurte fica então pronto para comercialização/consumo (Santos, 2011).

6.3. Valor Nutricional e Benefícios para a Saúde.

O iogurte é um produto amplamente recomendado pelas suas características sensoriais, probióticas e nutricionais (Rodas et al., 2001).

O leite e os seus derivados são os maiores constituintes de uma dieta regular, fornecendo cerca de 30% de proteínas e lípidos e 80% do cálcio necessário para o consumo humano. O seu consumo regular apresenta inúmeras vantagens para a saúde para os seus consumidores, tais como, a regulação da flora intestinal e do seu funcionamento, uma vez que a presença das bactérias lácticas no intestino reduz os efeitos de microrganismos patogénicos responsáveis por processos de putrefação, inibe a ação tóxica de determinados agentes que induzem o aparecimento de cancro do cólon, atenua distúrbios gastrointestinais (diarreia, obstipação, gastroenterite) e fortalece as nossas defesas contra microrganismos indesejáveis (Mathias, 2011; Santos, 2011).

O iogurte é uma excelente fonte de sais minerais, como potássio, zinco, fósforo e, principalmente, cálcio. O iogurte é também rico em proteínas (caseína, lactoglobulina e lactoalbumina) e vitaminas do complexo B (Tabela 5) (Mathias, 2011).

A fermentação a partir das bactérias lácticas, além de facilitar a digestão da lactose, melhora também a das proteínas, aumenta os níveis de vitaminas do complexo B e melhora a capacidade de absorção dos minerais. Outra das suas virtudes prende-se com a regulação da flora intestinal e do seu funcionamento. A presença das bactérias lácticas no intestino reduz os efeitos de microrganismos patogénicos responsáveis por processos de putrefação, inibe a ação tóxica de determinados agentes que induzem o aparecimento de cancro do cólon, atenua distúrbios gastrointestinais (diarreia, obstipação, gastroenterite) e fortalece as nossas defesas contra microrganismos indesejáveis (Santos, 2011).

Tabela 5- Composição nutricional de um iogurte natural. Fonte: (www.insa.pt)

Componente	Valor por 100g
Energia kcal	54
Lípidos g	1,8
Hidratos de carbono g	5
Fibra Alimentar g	0
Proteína g	4,2
Água g	87,9
Colesterol mg	6
Vitamina Aµg	30
Vitamina B1 mg	0,03
Vitamina B2 mg	0,24
Vitamina B6 mg	0,03
Vitamina B12µg	0
Vitamina Cµg	0
Cinza g	0,75
Sódio mg	62
Potássio mg	180
Cálcio mg	120
Fósforo (mg)	110
Magnésio (mg)	12
Ferro mg	0,2
Zinco mg	0,5

III. Desenvolvimento Experimental

7. Material e métodos

7.1. Bagaço

O bagaço de maçã é obtido industrialmente durante a produção de sumos concentrados de maçã e é um material semi-sólido que é obtido após a trituração e prensagem a frio dos frutos. A sua constituição é a casca, a polpa, sementes e pedúnculos das maçãs. O bagaço analisado no presente trabalho tinha na sua constituição várias variedades de maçãs com as seguintes percentagens: 60% Golden, 38% Starking e 2% Reineta. As amostras foram mantidas a -18 °C durante todo o trabalho laboratorial.

O bagaço de maçã foi analisado maioritariamente em fresco (Figura 11), à exceção da determinação da gordura e da fibra em que foi necessário realizar uma desidratação. Parte do bagaço foi secado (22 horas a 40 °C e 8 horas a 60 °C), moído (num moinho de café), tendo-se assim obtido duas farinhas (Figura 12B).



Figura 11- Bagaço de maçã fresco



Figura 12- A) Bagaço de maçã secado; B) Farinha.

7.2. Caracterização Química do Bagaço de Maçã e Farinhas.

Os métodos a seguir apresentados foram realizados ao bagaço de maçã e às farinhas.

7.2.1. Determinação da Humidade.

A humidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição. A água que vai ser efetivamente determinada vai depender do método analítico empregue, somente a água livre é quantificada com certeza em todos os métodos. A humidade é determinada pela perda de massa sofrida pelo produto submetido à secagem em estufa a 105 °C, até massa constante (Balascio et al., 1989). Para a determinação da humidade do subproduto de maçã e das farinhas usou-se uma balança de halogéneo (Figura 13) a qual foi programada a uma velocidade 5 e temperatura de 130 °C em que se colocou 2 g de amostra para cada ensaio. Utilizou-se este método devido ao facto de ser mais rápido e permitir um resultado preciso. A determinação foi feita em triplicado.

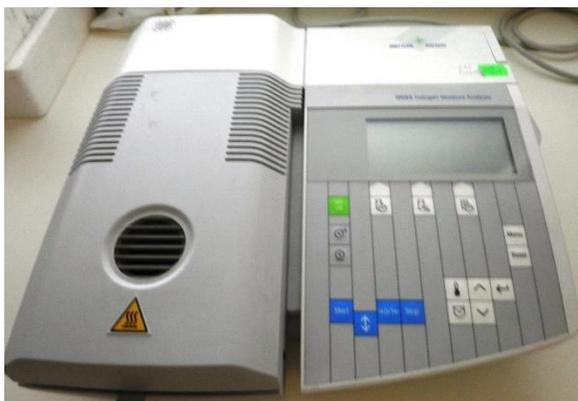


Figura 13. - Balança de Halogénio

7.2.2. Determinação da acidez total

A determinação da acidez foi realizada de acordo com a NP-1421 de 1977 destinada a géneros alimentícios derivados de frutos e produtos hortícolas. Por definição, acidez total é a soma dos ácidos minerais e orgânicos. Segundo a NP 1421, a acidez pode ser expressa, convencionalmente, em gramas dos seguintes ácidos orgânicos: ácido cítrico anidro ou monohidratado, ácido málico ou ácido tartárico.

O procedimento experimental iniciou-se com a pesagem de 25 g de amostra (base húmida) e colocou-se num erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 50 mL da água destilada (previamente fervida e neutralizada). Adaptou-se um condensador de refluxo e aqueceu-se em banho-maria

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

durante 30 minutos (Figura 14). Esta mistura foi arrefecida e quantitativamente transferida para um balão de diluição de 250 mL, tendo-se completado o volume com água destilada neutralizada. Seguidamente precedeu-se a uma filtração com um filtro G2 e transferiu-se o filtrado para um balão de diluição de 250 mL. A determinação da acidez foi feita por titulação de 25 mL de filtrado com uma solução de hidróxido de sódio (0,025N) na presença de fenolftaleína.

O cálculo do valor da acidez foi realizado de acordo com a NP 1421. Para a sua determinação realizaram-se 3 ensaios independentes, cada um em triplicado.



Figura 14- Condensador de refluxo e aquecimento em banho- maria usado na determinação da acidez.

7.2.3. Determinação dos Açúcares Totais e Redutores.

Para determinação dos açúcares redutores e totais foi seguida a NP- 1420 de 1987 destinada a frutos, produtos hortícolas e seus derivados. Nesta norma é utilizada a técnica de Luff-Schoorl. Este método aplica-se a produtos alimentares que contenham açúcares de baixo peso molecular. Os açúcares redutores são oxidados, enquanto o Cu^{2+} (do reagente Luff-Schoorl) é reduzido a Cu^+ . A quantidade em excesso de reagente Luff-Schoorl, que não reage com os açúcares, reage com o KI, oxidando o ião I^- a I_2 . O I_2 formado vai ser titulado pelo tiosulfato de sódio. Assim, quanto maior a quantidade de açúcares redutores, menor o excesso de reagente

Luff-Schoorl, menor a quantidade de iodo formado, logo menor o volume de titulante gasto (Lemos e Gonçalves, 2014). Realizou-se uma modificação ao procedimento experimental da referida norma, tendo-se alterado o tempo de ebulição de 8 para 30 minutos com o objetivo de permitir a extração completa dos açúcares.

Inicialmente pesaram-se rigorosamente cerca de 5 g (base húmida) de amostra e transferiu-se para um balão de diluição de 200 mL, lavando-se com 50 mL de água destilada.

Nesta etapa designada por defecação, a este balão, adicionaram-se 12,5 mL de solução de Carrez I mais 12,5 mL de solução de Carrez II, agitou-se e perpez-se o volume do balão com água destilada. Agitou-se novamente filtrando-se logo após a formação de um precipitado branco. Uma parte do filtrado foi submetido a inversão para determinação dos açúcares totais e outra foi utilizada diretamente para a determinação dos açúcares redutores.

A etapa da inversão foi realizada apenas para a determinação do teor de açúcares totais, Num erlenmeyer de 100 mL, juntaram-se 50 mL do filtrado obtido após a defecação, e 3,5 mL de ácido clorídrico ($1,19 \text{ g/cm}^3$) agitou-se e colocou-se em banho de água a $69 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 5 minutos (após o líquido contido no interior ter atingido essa temperatura). Arrefeceu-se de imediato e neutralizou-se com uma solução de hidróxido de sódio em presença de fenolftaleína, até à mudança para uma cor rosa. Adicionou-se umas gotas de ácido clorídrico diluído (1+9) até o meio ficar ligeiramente acidificado. O pH do meio foi controlado com a ajuda do potenciômetro, agitou-se e transferiu-se para um balão de diluição de 100 mL e perpez-se o volume do balão com água destilada

Para determinação dos açúcares redutores mediu-se 25 mL da solução de Luff-Schoorl e adicionou-se 10 mL, da solução defecada, para um balão de fundo redondo de 250 mL, adicionou-se água destilada de modo a perfazer um volume total de 50 mL, e foram utilizados reguladores de ebulição. O balão foi adaptado a um condensador de refluxo e com o auxílio de uma manta calorífica, levou-se à ebulição que teve início passados dois minutos e manteve-se em ebulição durante 30 minutos exactos. Passado o tempo de ebulição arrefeceu-se de imediato, sem agitar, sobre uma corrente de água fria. Após 2 minutos, adicionou-se 9 mL de solução de iodeto de potássio ($0,166 \text{ g/cm}^3$), 20 mL de solução de ácido sulfúrico ($0,25 \text{ g/cm}^3$) agitou-se até cessar a efervescência. Titulou-se o iodo formado com a solução de tiosulfato de sódio (0,1 N), juntando 2 mL de cozimento de amido (após apresentar uma coloração mostarda, que ocorreu depois de adicionar aproximadamente 8 mL de tiosulfato de sódio), até à viragem de cor de azul para branco (Figura 15).



Figura 15- Determinação dos açúcares redutores e totais. Complexo formado antes da titulação (castanho) e depois da titulação (branco).

Através da diferença de volumes de solução de tiosulfato de sódio, gasto no ensaio em branco e no ensaio com amostra é possível determinar a massa de açúcar invertido, expressa em miligramas, mediante a tabela que se encontra em anexo (Anexo 1).

Para a determinação dos açúcares totais procedeu-se conforme acima descrito para a determinação dos açúcares redutores, apenas foi substituído o volume da solução defecada por um volume da solução obtida pela inversão.

O cálculo da percentagem de açúcares foi determinado de acordo com os cálculos apresentados na norma utilizada para a determinação dos açúcares e realizaram-se 2 ensaios independentes, cada um em duplicado.

$$\% \text{ Açúcares Redutores} = \frac{20 \times m_r}{V' \times m}$$

$$\% \text{ Açúcares Totais} = \frac{20 \times m_t}{V' \times m}$$

Em que m_r e m_t representam a massa (mg) de açúcar invertido, para os açúcares redutores e totais respectivamente, e V' o volume de filtrado após defecação e inversão.

7.2.4. Determinação das Cinzas

As cinzas de um alimento são o termo analítico correspondente ao resíduo inorgânico que fica, após combustão da matéria orgânica. A determinação das cinzas totais é considerada um

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

parâmetro de avaliação da qualidade de um produto, sendo em alguns casos importante na sua caracterização (Lemos, 2011).

No procedimento experimental, foram pesados os cadinhos previamente calcinados a 550 °C e posteriormente arrefecidos em exsiccador até à temperatura ambiente. Seguidamente pesou-se rigorosamente cerca de 2 g da amostra (base húmida). Antes de serem colocados na mufla (Figura 16) efetuou-se uma primeira incineração com o auxílio do bico de bunsen para facilitar a calcinação. As amostras foram então colocadas na mufla até ser obtido um resíduo branco (aproximadamente 1 hora) a 550 °C. No final do processo de calcinação arrefeceram-se os cadinhos no exsiccador. Os cadinhos mais as cinzas resultantes foram pesados rigorosamente após o seu arrefecimento até a temperatura ambiente. Foram realizados 2 ensaios independentes, cada um em duplicado.

O valor das cinzas da amostra determina-se aplicando a seguinte equação:

$$\% \text{ Cinza} = \frac{C_2 - C_0}{C_1} \times 100$$

Em que C_0 corresponde ao peso do cadinho, C_1 a massa da amostra e C_2 a massa final do cadinho e da cinza. A determinação da cinza foi realizada em duplicado.



Figura 16- Mufla com cadinhos no seu interior.

7.2.5. Determinação da Matéria Gorda

A determinação do teor de gordura foi realizada através de uma extração, utilizando éter de petróleo, como solvente e um aparelho de Soxhlet (Figura 17), seguindo procedimento da AOAC (1990). Foi efetuada da seguinte forma: pesou-se um balão de fundo redondo (m_1) de 250mL (previamente seco a 100-105 °C, durante 30 minutos e arrefecido num exsiccador). Seguidamente pesou-se rigorosamente cerca de 10 g de amostra (base húmida) (m_0) e introduzidas num cartucho de celulose, o qual foi por sua vez colocado no extrator de soxhlet. O balão possuía cerca 175 mL de éter de petróleo. A extração decorreu durante 16 horas, num fluxo de 2/3 gotas por segundo. O solvente foi recuperado por evaporação e condensação num evaporador rotativo. Posteriormente o balão foi levado à estufa a uma temperatura de 105 °C, arrefecido e pesado. Este processo foi repetido até obtenção de peso constante (m_2). Para a determinação da matéria gorda foram realizados 2 ensaios independentes, cada um em duplicado. A percentagem de gordura foi obtida através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Gordura} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$



Figura 17- Aparelho de Soxhlet, em funcionamento.

7.2.6. Determinação do Teor de Proteína.

Para determinação da proteína bruta foi utilizado o método de Kjeldahl que se encontra dividido em três fases: mineralização, destilação e titulação.

Este método determina o azoto (N) orgânico total, ou seja o proteico e o não proteico orgânico. Porém, na maioria dos alimentos, o (N) não proteico representa muito pouco no total. A razão entre o azoto medido e a proteína estimada depende do tipo de amostra (alimento, variedade, condições de crescimento entre outras) (Lemos e Gonçalves, 2014).

Para a realização deste procedimento pesou-se 10 g de amostra (base húmida) e colocou-se em um Tubo de Kjeldahl onde foram adicionados 20 mL de ácido sulfúrico concentrado e 2 g de catalisador de Kjeldhal (composição: sulfato de potássio (96,5%), selénio (2%), sulfato de cobre pentahidratado (1,5%)). Os tubos foram colocados em aquecimento à temperatura de 350 °C até descoloração completa durante duas horas. Este aquecimento ocorreu em um mineralizador. Após a mineralização deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.

Seguidamente procedeu-se à destilação, esta segunda etapa ocorreu num destilador automático que adicionou 50 mL de água, 50 mL NaOH 35% (m/v) no tubo de Kjeldhal, e 25 mL de ácido bórico a 4% num erlenmeyer de 250 mL. Foi recolhido cerca de 150 mL de destilado e adicionou-se 2 gotas de indicador misto. Por fim efetuou-se a titulação do destilado com solução de HCl 0,1N até se verificar a viragem de cor (verde para rosa). Foram realizados 2 ensaios independentes, cada um em duplicado. Na figura 18 estão rerepresentadas as três etapas do procedimento da determinação da proteína. A % de proteína é determinada pela expressão a seguir apresentada:

$$\% (N)Azoto = \frac{(V_1 - V_0) \times C_{HCl} \times 1,4}{m}$$

Na expressão anterior V_1 representa o volume gasto na titulação, V_0 o volume gasto na titulação no ensaio em branco, C_{HCl} a concentração da solução de HCl, e m a massa de amostra. Para se obter a % de proteína foi necessário utilizar o coeficiente proteico, como se pode observar na expressão a seguir apresentada. O coeficiente proteico ou fator de correção utilizado foi 6,25 por se tratar de um fator geral.

$$\% Proteína = \%N \times 6,25$$

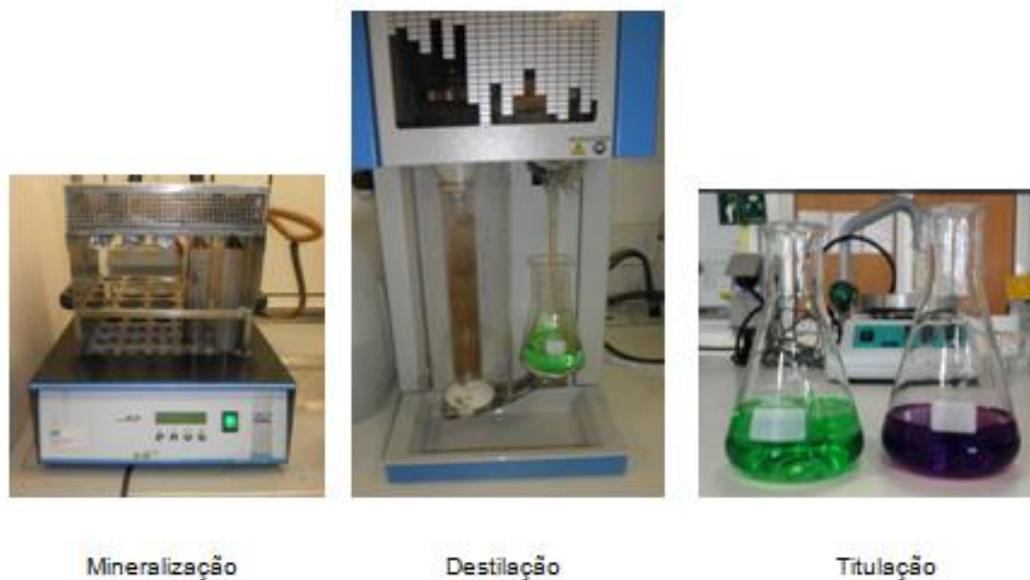


Figura 18- Esquema da determinação da proteína, mineralização, destilação e titulação, antes e depois da viragem de cor (verde para rosa)

7.2.7. Determinação da Fibra Dietética Solúvel e Insolúvel

Os procedimentos para a determinação da fibra dietética total, foram baseados nos métodos descritos por (Lee et al., 1992) e (Prosky e Furda, 1998) (AOAC 991.43, 985.29 AOAC, AACC 32-07.01 e AACC 32-05.01), recorrendo ao “total dietary fiber assay kit” da Megazyme.

As determinações foram realizadas em duplicado. As amostras foram sujeitas a três incubações com a duração de 30 minutos cada. A primeira incubação teve como objetivo a gelatinização sendo realizada com a α -amilase termoestável, a uma temperatura entre 98 e 100 °C com agitação contínua. Na segunda e terceira incubação foi digerida pela protease e amiloglucosidase à temperatura de 60 °C com agitação contínua.

A mistura enzimática obtida, foi filtrada com um cadinho filtrante e lavada com água destilada pré - aquecida a 70 °C. O filtrado e as águas de lavagem foram guardados para determinação da fibra dietética solúvel. Às águas foi adicionado cerca de 4 volumes (225 mL) de etanol 95% pré - aquecido a 60 °C. Deixou-se repousar durante 1h à temperatura ambiente para garantir que todo o conteúdo de fibras solúveis em solução precipitasse. Passado o tempo de repouso realizou-se a filtração das águas e do filtrado, resultou um novo resíduo que foi lavado com etanol a 78%, etanol a 95% e acetona. Os cadinhos que continham os resíduos foram secos durante 8 horas a 103 °C e determinada a sua massa posteriormente. Dos dois resíduos obtidos da amostra, um foi usado para a determinação da proteína através do método de Kjeldahl e o outro para a determinação da cinza por incineração a 525 °C durante 5 horas.

O cadinho que contém o resíduo obtido da filtração da mistura enzimática foi lavado novamente com etanol 95% e acetona seguidamente secos durante 8 horas a 103 °C numa estufa e determinada a sua massa posteriormente. Dos dois resíduos obtidos da amostra, um foi usado para a determinação da proteína através do método de Kjeldahl e o outro para a determinação da cinza por incineração a 525 °C durante 5 horas. Na Figura 19 estão representados os dois resíduos obtidos (solúvel e insolúvel) e também o precipitado formado pelas águas de lavagem. A Figura 20 mostra um esquema do processo de determinação da fibra dietética.

As percentagens de Fibra dietética solúvel e insolúvel foram obtidas através das seguintes expressões:

$$\%FDS = \frac{M_S - P_S - C_S}{M_A} \times 100$$

$$\%FDI = \frac{M_I - P_I - C_I}{M_A} \times 100$$

Em que, M_S representa a massa dos resíduos solúveis, P_S massa de proteína da fibra solúvel, e C_S massa de cinza solúvel, M_I representa a massa dos resíduos insolúveis, P_I massa de proteína da fibra insolúvel, e C_I massa de cinza insolúvel.

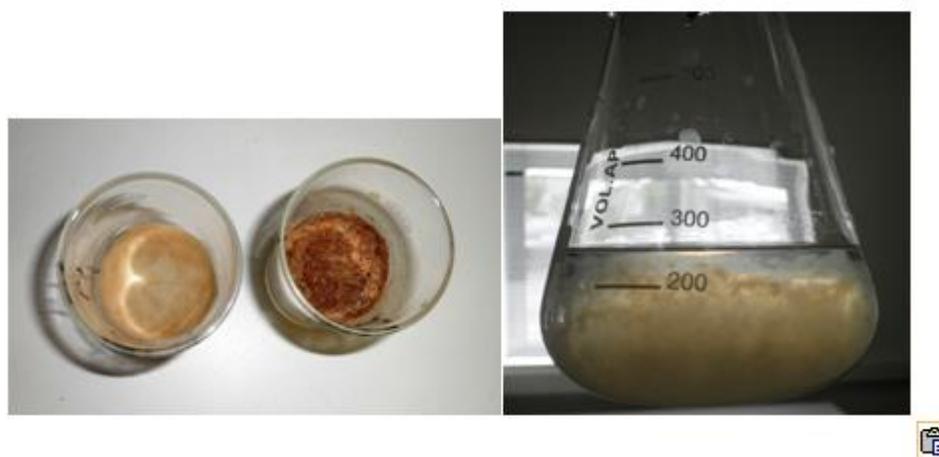


Figura 19- Cadinhos filtrantes com resíduo solúvel e insolúvel. Precipitado formado das águas de lavagem.

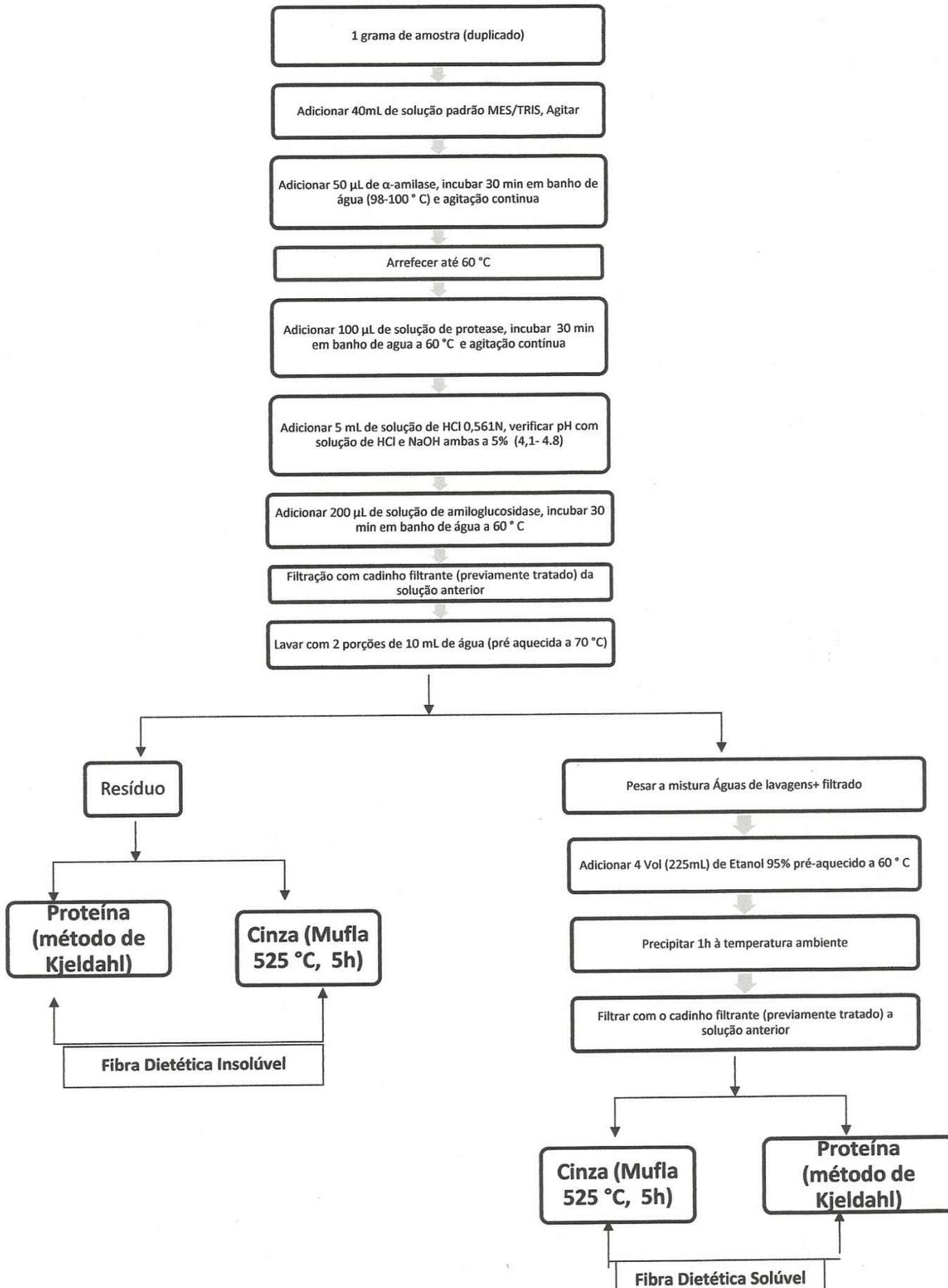


Figura 20- Esquema simplificado da determinação das fibras dietéticas solúveis e insolúveis.

8. Obtenção de Extratos

Com o objectivo de obter extratos com propriedades bioactivas, o bagaço de maçã foi submetido a vários processos de extração, utilizando-se como solventes, a (água ou uma solução de água e etanol *food grade* (50:50, v:v)). A metodologia das extrações consistiu em pesar rigorosamente 15 g de amostra (base húmida) e colocar em contacto com 200 mL de solvente, com uma agitação de 300/400 rotações por minuto (rpm). O tempo das extrações etanólicas foi de 8 horas (4h+4h) em que se realizaram duas extrações sucessivas de 4h, com renovação de solvente, ou seja no final da primeira extração o sobrenadante foi recolhido por filtração e adicionado 200 mL de novo solvente. No caso das extrações aquosas, tiveram a duração de 1h e o erlenmeyer de 250 mL que continha a amostra com a água só foi colocado no banho de água quente (100 °C) quando este se encontrava em ebulição, (esperou-se aproximadamente 20 min para a água atingir a temperatura e só depois se contabilizou o tempo e extração) e foi realizada com o auxílio de um condensador de refluxo. As extrações etanólicas foram efetuadas à temperatura ambiente.

Terminado o tempo de extração, o extrato foi filtrado primeiro com um funil de vidro normal e algodão hidrófilo, posteriormente com um filtro G3, e por fim, através do filtro G4. Os volumes de cada extração foram colocados num balão de fundo redondo e concentrados até 10 mL, no evaporador rotativo a 180 rpm e à temperatura de 40 °C no caso das aquosas e de 30 °C para os extratos etanólicos.

Tendo em consideração os resultados da atividade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos anteriormente obtido no âmbito do projeto 38126- ProfitApple (resultados não apresentados), optou-se por reduzir o tempo de extração para 10 min, mantendo a razão massa/solvente (7,5 g amostra / 100mL de solvente).

Depois de analisados os resultados obtidos das análises sensoriais realizadas, aos iogurtes, decidiu-se optar por incorporar extratos aquosos. Com o objetivo de obter extratos mais ricos em compostos bioativos, foram realizadas repetições das extrações aquosas de 10 minutos. Assim realizaram-se 3, 4, 5 e 6 repetições como mostra a Figura 21. Os volumes das sucessivas extrações com repetição foram misturados num balão de fundo redondo e concentrados até 10 mL, no evaporador rotativo a 180 rpm e à temperatura de 40°C.

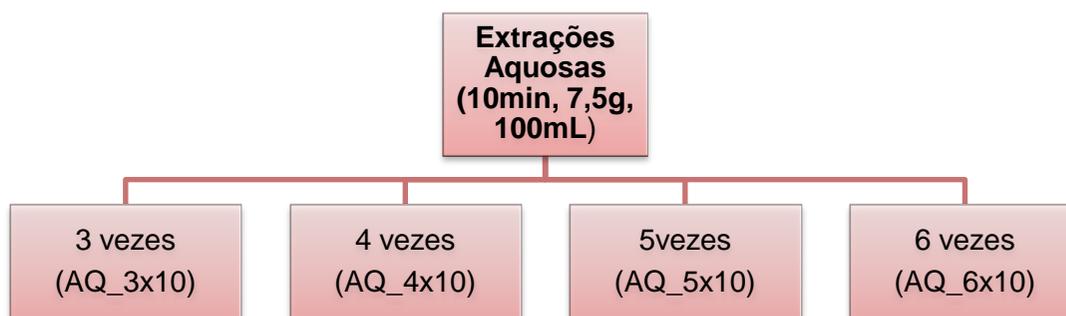


Figura 21- Esquema das repetições realizadas à extração aquosa.

O extrato selecionado para incorporar no iogurte (AQ_6x10) foi caracterizado quanto ao seu teor em atividade antioxidante (método de ABTS) e compostos fenólicos (método Folin-Ciocalteu)

8.1.Determinação dos Compostos Fenólicos

O método Folin-Ciocalteu consiste na redução a pH alcalino do heteropolianião molibdotungsteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, realizada pelos compostos fenólicos, na forma de íão fenolato da amostra e que promove o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 760 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos.

Na determinação dos compostos fenólicos foi usado o método de Folin-Ciocalteu (Ferreira et al., 2002). Num tubo de ensaio de 10 mL colocou-se 83 μ L de amostra (devidamente diluída) 1520 μ L de água e 100 μ L de reagente Folin, aguardou-se 2 minutos e posteriormente colocou-se 300 μ L de solução de carbonato de sódio a 17%. Seguidamente colocou-se num banho de água a 40 °C durante 30 minutos, deixando-se depois arrefecer em banho de água fria. Em simultâneo foi realizado um ensaio em branco (substitui-se o volume de amostra por 1600 μ L de água). A leitura das absorvâncias realizou-se em um espectrofotómetro a um comprimento de onda de 765nm. Os ensaios foram realizados em triplicado. Foi elaborada paralelamente uma curva de calibração, apresentada na Figura 22, utilizando como padrão, soluções de ácido gálico, a partir da qual foi possível quantificar os compostos fenólicos.

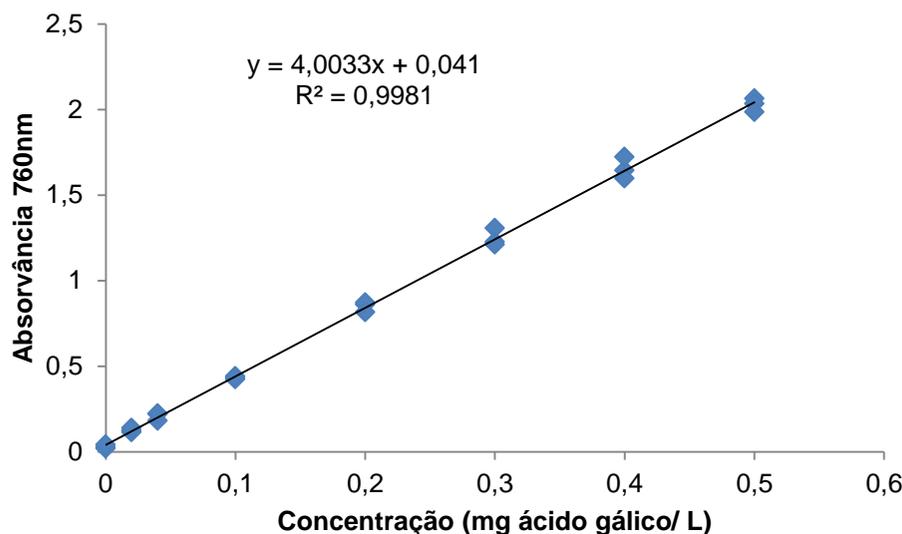


Figura 22- Reta de calibração obtida com padrões de ácido gálico, utilizada na determinação dos compostos fenólicos.

8.2. Determinação da Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Esta metodologia, permite medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (Re et al., 1999).

O $ABTS^{\bullet+}$ é gerado pela reação de ABTS (7 mM) numa solução de $K_2O_8S_2$ (2,45 mM) mantida no escuro durante aproximadamente 12 a 16 horas. A solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol ou em solução tampão ($\pm 1:80$) e a sua absorvância a 734 nm ajustada a 0,70 (autozero realizado com solução tampão ou etanol) . Num tubo juntaram-se 2,0 mL da solução de $ABTS^{\bullet+}$ e 0,1 mL de amostra (solução tampão ou etanol, no caso do ensaio em branco) e agitou-se. Colocou-se no escuro durante 15 min, e leu-se a absorvância a 734 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado. Com os valores de absorvância foi possível determinar a % de inibição utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_C - A_A}{A_A} \times 100$$

Onde:

A_C = absorvância da solução de ABTS \bullet^+

A_A = absorvância da amostra com o ABTS \bullet^+

Foi elaborada em paralelo uma curva de calibração, apresentada na Figura 23, utilizando como padrão, soluções de Trolox, com concentrações que variaram entre 0,08 e 0,4 g TE/L. A atividade antioxidante foi determinada através da equação da curva de calibração obtida.

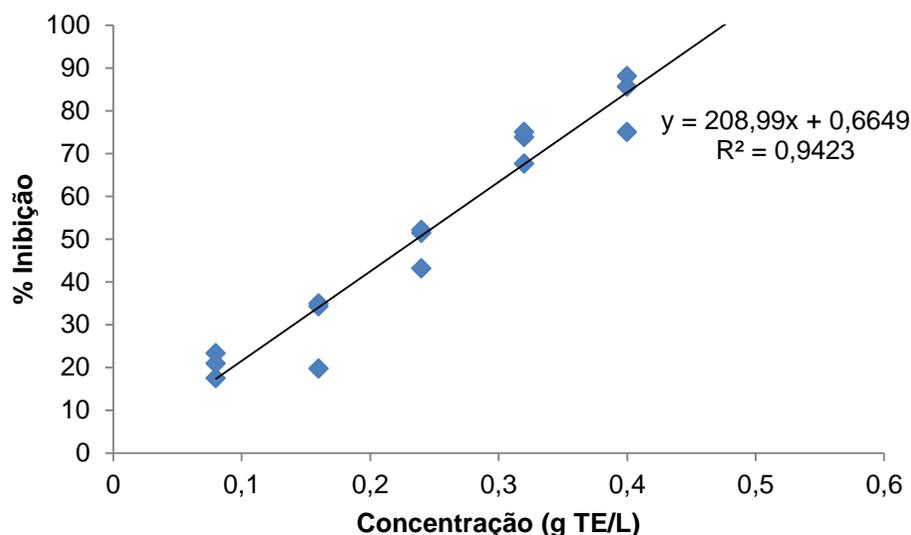


Figura 23- Reta de calibração elaborada com padrões de Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.

9. Metodologias Microbiológicas

As metodologias a seguir apresentadas foram efetuadas ao bagaço de maçã, às farinhas obtidas pela secagem do bagaço de maçã seco a 40 °C e a 60 °C, ao extrato aquoso e etanólico. Avaliou-se os seguintes grupos de microrganismos: mesófilos a 30 °C, fungos, coliformes a 37 °C e *Escherichia coli* (*E. coli*). O bagaço de maçã encontrava-se congelado, a uma temperatura de -18 °C. As farinhas encontravam-se no estado sólido à temperatura ambiente, mantidas em exsiccador e os extratos encontravam-se no estado líquido e mantidos no frio, cerca de 3 °C até serem utilizados. Os bagaços de maçã e a farinha apresentavam uma formulação sólida e os extratos apresentavam uma formulação líquida.

Foi utilizado o método de placas, tendo-se seguido os procedimentos descritos nas normas nacionais e internacionais. Assim para os mesófilos a 30 °C foi utilizada a NP 4405:2002 e ISO 4833: 2003, para os fungos a ISO 21527-1:2008, no caso dos coliformes a ISO 4832:2006 e para a *E. coli* utilizou-se a ISO16649-2: 2001. Todo o material e os respectivos meios de cultura foram preparados e esterilizados de acordo com o preceituado nas normas referidas.

9.1.1. Preparação dos meios de cultura

Foi preparado 500 mL do meio (MRD) Major recover diluí Saline Peptone Water. Este meio foi utilizado como solução diluidora.

Para a determinação dos mesófilos a 30° C, preparou-se 300 mL plate count agar (PCA) .

Para a determinação de fungos (leveduras e bolores), preparou-se 300 mL RoseBengal.

Para a determinação dos coliformes, preparou-se 300mL Cristal violet et au rouge neutre, (VRBL).

No caso da *E. coli* preparou-se 300 mL de Tryptone Bile X- Glucuronide (TBX).

9.1.2. Preparação das solução mãe e diluições.

No caso do bagaço e das farinhas a solução mãe foi obtida pesando-se 10 g de amostra e adicionou-se 90 mL de solução diluidora MRD, num saco esterilizado, agitou-se no stomacher e obteve-se a solução mãe (10^{-1}).

Para obtenção da diluição 10^{-2} retirou-se 1 mL da solução anterior e colocou-se num tubo de ensaio contendo 9 mL de MRD. Seguidamente obteve - se a diluição 10^{-3} retirando 1 mL da solução anterior e adicionando a 9 mL de MRD contidos num tubo. As diluições foram efetuadas em duplicado.

No caso dos extratos procedeu-se da mesma forma como foi descrito anteriormente, mas como estes se encontravam no estado líquido, a solução mãe foi obtida retirando 1 mL de cada extrato e colocado num tubo com 9 mL de MRD. As diluições foram obtidas da mesma forma como anteriormente descrito o bagaço e para as farinhas.

9.1.3. Determinação dos Microrganismos

Para determinação dos mesofilos, coliformes e *E. coli*, foi efetuada a técnica de incorporação por microprogação. Foi adicionado 1 mL de solução mãe em cada placa com 15mL do respetivo meio de cultura indicado para cada microrganismo. Para os mesófilos a 30 °C usou-se o meio PCA previamente fundido e arrefecido aproximadamente a ± 45 °C em cada placa; para os coliformes utilizou-se o meio VRBL também previamente fundido e arrefecido aproximadamente a ± 47 °C em cada placa; e para a *E. coli* foi utilizado o TBX depois de fundido e arrefecido aproximadamente a ± 47 °C em cada placa. Foram efetuados movimento rotativo de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. Deixou-se solidificar colocando as

placas numa superfície horizontal e precedeu-se á incubação em estufa (com o fundo virado para cima). Para os mesófilos incubou-se durante 72 horas a 30 °C, para os coliformes incubou-se durante 24 horas a 37 °C e para a *E. coli* incubou-se durante 24 horas a 42 °C. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias. Repetiu-se o mesmo processo para as diluições.

No caso da determinação dos fungos foi utilizada outro tipo de técnica. Foi utilizada a incorporação por espalhamento de superfície. Neste caso foram colocado os 15 mL de meio Rose Bengal nas placas e deixado solidificar. Posteriormente semeou-se 0,5 mL da solução mãe, com o auxílio de um espalhador previamente esterilizado procedeu-se ao espalhamento da sementeira, tendo o cuidado de não perfurar o meio de cultura. Deixou-se solidificar colocando as placas numa superfície horizontal. Incubou-se as placas (com o fundo virado para cima) na estufa à temperatura de 25 °C durante 5 dias, no entanto foram retirados da estufa e analisados ao terceiro dia. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias. Repetiu-se o mesmo processo para as diluições.

10. Iogurtes

10.1. Formulação dos iogurtes

A formulação final do iogurte foi obtida após a realização de experiências, modificando as proporções dos ingredientes. Variou-se as quantidades de açúcar (0 g, 10 g e 40 g) e do leite em pó (5 g, 10 g, 20 g e 200 g), e também do tempo de incubação numa iogurteira doméstica (8 h, 10 h, 12 h e 14 h) como mostra a Tabela 6. A escolha da formulação e do tempo de incubação foi feita tendo em conta os resultados das provas sensoriais realizadas aos iogurtes.

O processo de fabrico (Figura 24) consistiu em misturar todos os ingredientes e no final adicionou-se o volume de extrato selecionado (10 mL) individualmente em cada iogurte (125 mL). A seleção do extrato e do tempo de incubação foi efectuada tendo em conta os resultados de provas sensoriais de iogurtes com extratos incorporados e também quanto ao valor de atividade antioxidante que este incrementava ao iogurte). Assim, optou-se por um tempo de incubação de 10 h e uma formulação (formulação 6 da tabela 6) contendo 1 L de leite, 1 iogurte, 40 g de açúcar e 10 g de leite em pó.

Tabela 6 - Evolução das formulações dos iogurtes.

Ingrediente	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4	Formulação 5	Formulação 6
Leite (L)	1	1	1	1	1	1
Iogurte (uni)	1	1	1	1	1	1
Açúcar (g)	40	40	10	0	10	40
Leite em pó (g)	200	20	10	10	5	10
Tempo Incubação)	14h	8h/10h/12h	10h	10h	10h	10h



Figura 24- Incubação dos iogurtes.

10.2. Caracterização Química

Definida a formulação do iogurte (formulação 6), procedeu-se a sua caracterização química. Assim, caracterizou-se em simultâneo um iogurte controlo (sem incorporação de extrato) e um iogurte com incorporação de extrato, de modo a ser possível efetuar uma comparação das suas características. Aos iogurtes analisou-se as seguintes características químicas tais como a acidez total, a atividade antioxidante, o teor de açúcares totais, as cinzas, os compostos fenólicos, a fibra bruta, a humidade, o pH e a proteína bruta. Para as determinações das cinzas, fibra bruta e proteína bruta foi necessário efetuar uma secagem. A secagem foi realizada numa estufa durante 8 horas à temperatura de 60 °C, sendo a sua humidade final de aproximadamente 11%. Os procedimentos para determinação da acidez, cinzas, humidade, proteína bruta foram os mesmos anteriormente apresentados para o bagaço e farinhas. Para a determinação da atividade

antioxidante e dos compostos fenólicos dos iogurtes foi necessário efetuar uma extração com metanol dos iogurtes.

10.2.1. Determinação dos Açúcares Totais

A determinação dos açúcares totais dos iogurtes foi baseada na NP- 704 de 1994 destinada a iogurtes e outros leites fermentados. O procedimento consiste em: pesar 20 g de amostra, (base húmida) de seguida colocou-se num balão de diluição de 200 mL e adicionou-se 12,5 mL de solução de Carrez I e 12,5 mL de solução de Carrez II e perpez-se o volume com água destilada, agitou-se e filtrou-se para um balão de diluição de 100 mL. Mediu-se 50 mL do filtrado obtido anteriormente e 3,5 mL de ácido clorídrico a 37%. Agitou-se e colocou-se em banho a 70 °C durante 5 minutos. De seguida arrefeceu-se e neutralizou-se com solução aquosa de hidróxido de sódio em presença de fenoltaleína. Adicionou-se ácido clorídrico diluído (1+9) até o meio estar ligeiramente acidificado, agitou-se e perpez-se o volume. Mediu-se, para um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de solução de sulfato de cobre, 25 mL de solução alcalina tartárica e 50 mL do filtrado obtido anteriormente. Levou-se a mistura à ebulição durante 2 minutos. Terminada a ebulição, deixou-se repousar o precipitado e filtrou-se o líquido ainda quente, com o auxílio de uma bomba de vácuo e um kitasato de 500 mL, através do cadinho de fundo filtrante previamente tratado (G3) (lavou-se com solução de ácido nítrico, seguido de água quente, até eliminar todo o ácido, e por fim o etanol. Secou-se na estufa durante 30 minutos, arrefeceu-se no exsiccador e pesou-se). Lavou-se o erlenmyer e o precipitado com água aquecida a 60 °C, em seguida com 10 mL de álcool a 95% e 10 mL de éter dietílico. Secaram-se os cadinhos filtrantes (G3) em estufa a 102 °C, durante 30 minutos, arrefeceu-se num exsiccador e pesou-se. Esta determinação foi realizada em duplicado. A Figura 25 apresenta o aspeto final dos cadinhos utilizados na determinação dos açúcares totais dos iogurtes. o cálculo do teor de açúcares totais, expresso em percentagem de massa de açúcares invertido foi obtida através da seguinte expressão:

$$\% \text{ AçúcaresTotais} = 40 \times \frac{m_1}{V \times m}$$

Nesta expressão m_1 corresponde à massa (mg) de açúcares invertidos valores que se encontram no anexo 2, V o volume (cm^3) do filtrado após a defecação e inversão e m corresponde à massa da amostra (g) utilizada.

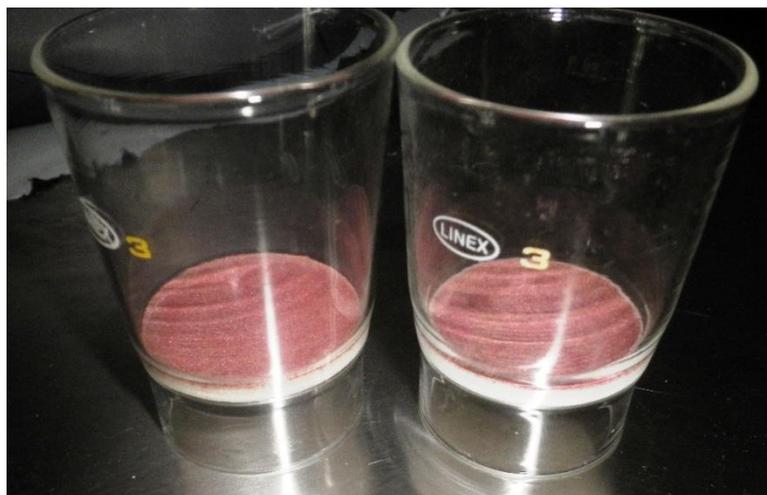


Figura 25- Determinação dos açúcares totais dos iogurtes.

10.2.2. Determinação da fibra bruta

A determinação da fibra bruta foi baseada no método de Weende, baseia-se na hidrólise ácida seguida de hidrólise básica da amostra num equipamento designado Dosi-fiber (Figura 26). Foi pesada 1,5 g de iogurte secado e transferiu-se para um cadinho filtrante. Colocou-se o cadinho no Dosi-fiber e deu-se início à hidrólise ácida quente, que consistiu em adicionar cerca de 100 mL de solução de ácido sulfúrico (com uma concentração de 0,13M) à amostra. Ligou-se a resistência na potência de 90%. Esperou-se que começasse a ferver e depois reduziu-se a potência para 30% e foi ligada a bomba de pressão. A hidrólise ácida a quente teve a duração de 1 hora. Terminada a hidrólise a quente parou-se o aquecimento e retirou-se o ácido (posição de aspiração) e lavou-se com água e filtrou-se. Seguidamente ocorreu a hidrólise básica, que consiste em repetir todo o processo anterior substituindo a solução de ácido sulfúrico por uma solução de hidróxido de sódio 0,2M. Finalizada a hidrólise básica, lavou-se os cadinhos com acetona, e colocaram-se a secar na estufa a 105 °C durante 1 hora, arrefeceram-se em exsiccador e pesaram-se (F_1). Posteriormente os cadinhos foram colocados na mufla a 500 °C durante 3 horas, depois de arrefecidos em exsiccador foram pesados (F_2). A % de fibra bruta pela seguinte expressão:

$$\% \text{ FibraBruta} = \frac{F_1 - F_2}{F_0} \times 100$$

Na expressão anterior F_1 é a massa do cadinho obtido na primeira pesagem, F_2 é a massa do cadinho na segunda pesagem e F_0 corresponde à massa de amostra pesada.



Figura 26-Aparelho utilizado na determinação da fibra bruta ("Dosi-fiber")

10.2.3. Determinação do pH

Para a se proceder a esta determinação utilizou-se um potenciômetro (Consort C831).

10.3. Obtenção de Extratos a partir do iogurte

Para a determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos a partir do iogurte foi necessário realizar extrações metanólicas. Estas extrações foram realizadas por adaptação do método proposto por Karaaslan, et al. (2011). O papel de filtro No. 1 Whatman foi substituído pelo filtro No. 4 Whatman (Cat N°1004 125) com o poro do tamanho 20-25 μm e não se efetuou a acidificação com metanol. Foram colocadas 20 g de iogurte num erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 30 mL de metanol e envolveu-se o Erlenmeyer em papel de alumínio. Foi colocado à temperatura ambiente tapado, em agitação 300/400 r.p.m. durante 2 h. Passado o tempo de extração, filtrou-se com um kitasato com o auxílio de um papel de filtro No4 Whatman. Guardou-se de seguida o extrato obtido no congelador. Este extrato foi usado para a quantificação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante.

10.4. Metodologias Microbiológicas

As metodologias a seguir apresentadas foram efetuadas aos iogurtes com extrato incorporado e ao controlo. Avaliou-se o crescimento das bactérias lácticas ao logo do processo de fabrico dos iogurtes. Foram retiradas amostras com uma diferença de 3 horas, sendo a primeira no início do processo e a última no final.

Foi utilizado o método de Breed baseado na NP-460: 1985. Todo o material e os respectivos meios de cultura foram preparados e esterilizados de acordo com o preceituado nas normas referidas.

10.4.1. Método de Breed

Este método de contagem directa, foi idealizado para a avaliação do número de bactérias do leite. Embora se possa aplicar na avaliação total de bactérias de outros substratos, nomeadamente, iogurtes, suspensões bacterianas, ou até em amostras de solo, é no leite que este método continua a ter uma aplicação generalizada (Pinto, 2015).

O método de Breed, por ser expedito, rápido e suficientemente rigoroso, fornece resultados imediatos e permite classificar os diversos lotes de leite, em diversas categorias de qualidade, de acordo com a carga bacteriana que possuem. É um método direto pois permite a contagem de microrganismos utilizando o microscópio fotónico e também de contagem total uma vez que todos os microrganismos são contabilizados (viáveis e não viáveis). Este método expressa-se em N/mL (número de microrganismos por volume de substrato) (Pinto, 2015).

10.4.2. Preparação dos meios de cultura

Foi preparado meio Saline Peptone Water que foi utilizado como solução diluidora.

10.4.3. Preparação das soluções Mães e Diluições.

Retirou-se 1 mL de cada iogurte (controlo e com extrato) e adicionou-se 9 mL da solução diluidora, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} .

10.4.4. Determinação do Crescimento das Bactérias Lácticas.

Preparou-se uma lâmina, bem limpa e desengordurada e colocou-se em cima do escantilhão de Breed, de seguida retirou-se assepticamente, com o auxílio de uma micropipeta 10 μ L da diluição 10^{-1} do iogurte e depositou-se, cuidadosamente, em cima da lâmina. Com a ansa ou agulha esterilizada e arrefecida, espalhou-se cuidadosamente, a amostra da diluição, de forma a não ultrapassar os limites da quadrícula de 1 cm de lado, inscrita no escantilhão. Com o auxílio de uma pinça, colocou-se a lâmina, voltada para cima e secou-se à chama do bico de Bunsen, numa posição em que suporte perfeitamente o calor. (Esta secagem deve ser demorada e gradual

para que o esfregaço não estilhace). Fixou-se o esfregaço, passando-o três vezes a lâmina pelo interior da chama do bico de Bunsen. Inundou-se o esfregaço com Azul de Toluidina e deixe actuar durante 5 minutos. Deitou-se fora o excesso de corante e lavou-se cuidadosamente com água. Absorveu-se o excesso de água com papel absorvente e foi acabada a secagem à chama do bico de Bunsen. Por fim observou-se ao microscópio e contou-se as bactérias e/ou agrupamentos de bactérias que se observou em cada campo microscópico.

O número de microrganismos por mL de iogurte foi determinado pela seguinte expressão:

$$N/mL = n \times 400000 \times \frac{1}{fd}$$

Na expressão anterior n expressa o número médio de bactérias contadas por campo, e fd representa o fator de diluição utilizado.

10.5 Análise Sensorial

Foram realizadas várias provas sensoriais nas diferentes fases do processo de obtenção dos iogurtes. Inicialmente realizaram-se análises sensoriais para definir qual a formulação ideal dos iogurtes, posteriormente para decidir qual o extrato a incorporar, e uma última para verificar qual a aceitação do iogurte fortificado pelo painel de provadores. A análise sensorial foi realizada com 20 indivíduos não treinados e sem seleção prévia. A prova envolveu 14 indivíduos do sexo feminino e 6 do sexo masculino de uma faixa etária compreendida entre os 18 e 50 anos. Aos provadores foram apresentados um prato de plástico descartável que continha as amostras codificadas, um copo de água e um guardanapo. No início da prova foi entregue a folha de prova para preenchimento.

Na folha de prova (anexos 4) encontravam-se os códigos das amostras e foi pedido aos provadores para caracterizarem o aroma/sabor de cada amostra numa escala de 1 a 5 (em que 1 correspondia a muito intenso e 5 ausente). Também se avaliou a firmeza dos iogurtes numa escala de 1 a 5 (em que 1 correspondia a muito firme e 5 muito líquido). A última questão relacionava-se com a apreciação final dos iogurtes, foi-lhes pedido que, numa escala de 1 a 5 (em que 1 correspondia a “muito agradável” e 5 correspondia a “muito desagradável”), caracterizassem os iogurtes de acordo com cinco parâmetros, particularmente o aroma, a cor, textura, sabor e aspeto geral e por fim apreciação global. No final pediu-se que, em termos globais, escolhessem a amostra preferida.

IV. Resultados e Discussão

11. Apresentação e Discussão de Resultados

Seguidamente são apresentados os resultados obtidos de todas as análises realizadas ao bagaço, farinhas e extratos. Estas análises tiveram como propósito verificar as suas propriedades químicas e microbiológicas e no caso das farinhas e dos extratos observar se estes possuíam as características desejáveis, em termos de ingrediente seguro, para posteriormente serem incorporados em alimentos, o que se verificou no caso do extrato aquoso.

11.1. Caracterização Química do Bagaço de Maçã e Farinhas

Seguidamente serão apresentados os resultados obtidos na caracterização química do bagaço e das farinhas. Pelos valores obtidos verificou-se que o bagaço de maçã é constituído maioritariamente por fibras dietéticas solúveis e açúcares, possuindo um baixo teor em matéria gorda e proteínas e também uma baixa acidez.

11.1.1. Determinação da Humidade

Na Tabela 7 apresentam-se os valores de humidade para o lote de bagaço estudado e para as farinhas. Pode afirmar-se que o lote de bagaço em estudo apresenta um teor de humidade de acordo com os valores encontrados na literatura (66,4-80,0%). Uma vez que o bagaço de maçã é um subproduto em que a água é o seu componente maioritário, os valores obtidos eram esperados. Esta elevada humidade é um dos principais problemas relativamente à conservação do bagaço pois elevados teores de humidade levam a uma degradação mais rápida.

As farinhas apresentam uma humidade relativamente baixa comparativamente aos bagaço em estudo, visto estas terem sido submetidas a um processo de secagem. As duas farinhas obtiveram teores de humidade próximos de 7%, o que permite que as farinhas possam ser armazenadas durante um longo período de tempo desde que sejam mantidas em frascos hermeticamente fechados (Coelho, et al. 2010).

Tabela 7- Valores da percentagem de humidade do bagaço e das farinhas.

Produto	% Humidade \pm DP
Bagaço	81,17 \pm 1,98
Farinha_40°C	7,76 \pm 1,52
Farinha_60°C	6,34 \pm 0,62

11.1.2. Determinação da Acidez

Na Figura 27 encontram-se os valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para a acidez total titulável (expressos em equivalentes de ácido málico) (base seca), para o bagaço e também para as farinhas obtidas a partir deste.

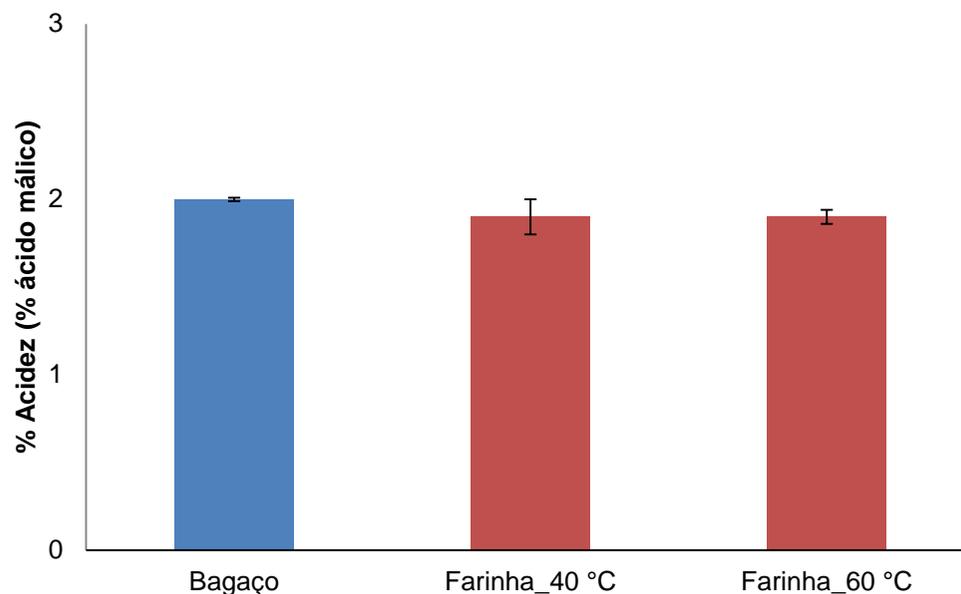


Figura 27- Valores de acidez do bagaço de maçã e das farinhas em percentagem, na base seca, expresso em equivalentes de ácido málico.

Analisando os valores de acidez obtidos dos subprodutos em estudo, observa-se que o bagaço apresentou o valor médio de acidez de 2,0%. Segundo Ramoa, (2014) a acidez média do bagaço de maçã com variedades de maçãs em proporções semelhantes ao do bagaço em estudo varia entre 1,04-1,15%, verificando-se que o bagaço aqui em foco apresenta uma percentagem de acidez mais elevada comparativamente aos obtidos nesse estudo. Por outro lado, Russo (2012) obteve uma acidez de 1,4%, um valor um pouco inferior ao obtido.

Comparativamente com os valores obtidos por Joshi e Attri, (2006), verificou-se que os valores de acidez obtidos neste estudo se encontram próximos dos encontrados na bibliografia. (1,0%-2,0%).

Relativamente às farinhas, estas apresentam ambas uma acidez de 1,9%.

11.1.3. Determinação dos Açúcares Redutores e Totais

Os valores médios e os respectivos desvios padrão para os açúcares totais e redutores das amostras de bagaço de maçã e de farinhas, expresso em % de matéria seca encontram-se representados na Figura 28.

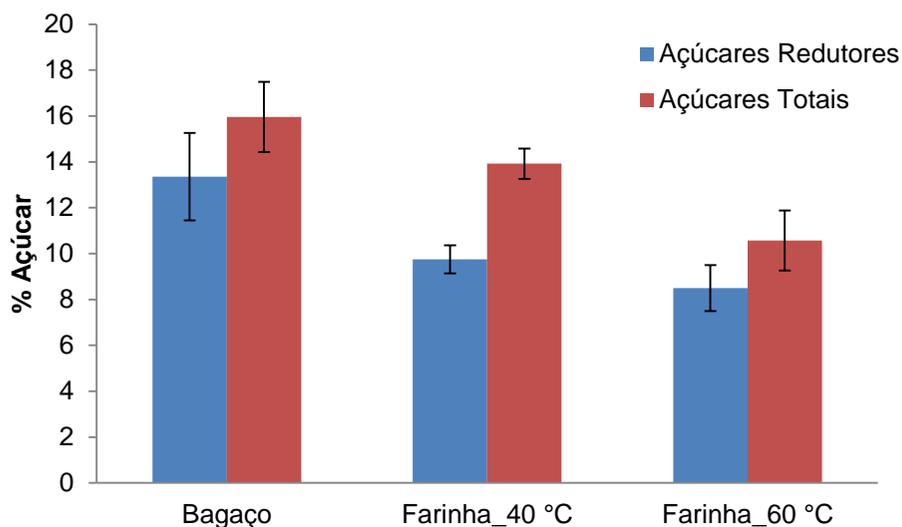


Figura 28- Conteúdo em açúcares redutores e totais em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas.

Por observação da Figura 28 verifica-se que o bagaço de maçã possuiu $15,96 \pm 1,53\%$ de açúcares totais e apresenta um valor médio de açúcares redutores de $13,35 \pm 1,91\%$. No estudo realizado por Ramoa, (2014) são apresentados teores de açúcares redutores compreendidos entre 9,2-14,8% e açúcares totais com variações entre 10,13-15,39%.

Estes valores são semelhantes aos descritos por Dhillona et al.,(2012), aproximadamente 10,8-15%, e ligeiramente superiores aos obtidos por Russo, (2012), 10,06% e 7,06%, respetivamente, para teores de açúcares totais e redutores. Por outro lado são inferiores aos 39,13% de açúcares totais e aos 30,34% de açúcares redutores quantificados por Saito et al., (2011). Os valores de açúcares encontrados para o bagaço de maçã são muito variados, uma vez que estes podem estar relacionados com as variedades de maçãs presentes em cada um. Outro dos fatores que pode influenciar o teor de açúcares presentes no bagaço é o seu processo tecnológico, ou seja o método de extração do sumo de maçã, sendo a prensagem e a lavagem os procedimentos que mais podem alterar o seu conteúdo. Um bagaço que sofreu uma lavagem mais longa possui um teor em açúcares menor do que um bagaço em que a lavagem foi mais curta. Esta duração de prensagem e lavagem por vezes depende da quantidade de maçãs que a indústria recepciona.

Em relação às farinhas, verifica-se que a farinha que se obteve por secagem do bagaço a 40 °C contém uma maior percentagem de açúcares totais, comparativamente com a farinha obtida pela secagem a 60 °C. O teor de açúcares não redutores da farinha obtida pela secagem a 40 °C é maior do que o da farinha a 60 °C. Estes resultados podem ser explicados tendo em conta as reações de maillard que ocorrem na secagem do bagaço.

11.1.4. Determinação das Cinzas

Os resultados obtidos na determinação das cinzas, expresso em percentagem em base seca, podem observar-se na Figura 29.

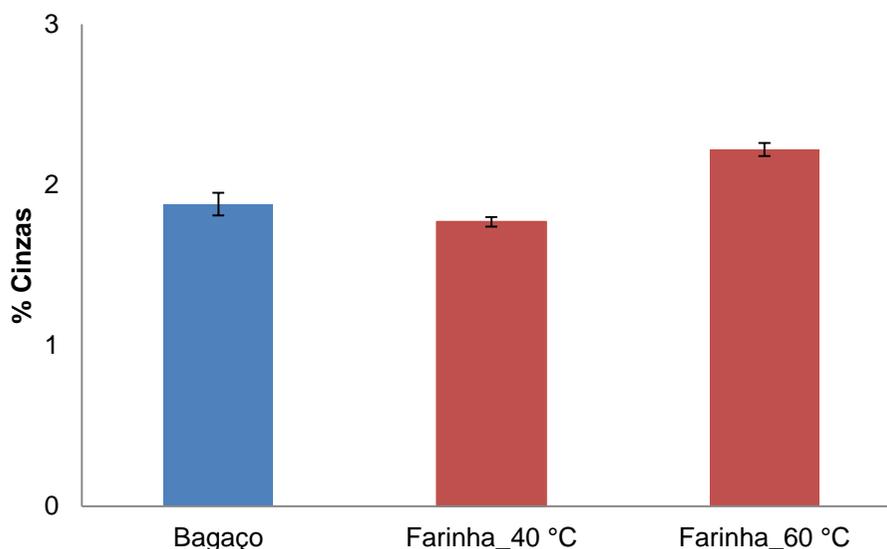


Figura 29-Valores de cinzas em percentagem, na base seca, obtida para o bagaço de maçã e farinhas.

Pela observação da figura anteriormente apresentada verifica-se que o teor de cinza média do bagaço é de $1,88 \pm 0,07$ %. Comparando estes resultados com os obtidos por Ramoa, (2014), verifica-se que o teor de cinzas é superior ao apresentado no estudo anterior ($0,68-1,61\% \pm 0,03$). Ainda, Macagnan et al., (2015) apresentaram valores de cinza de $1,26 \pm 0,12\%$, para bagaço de maçã obtido a partir das variedades Fuji e Gala, sendo esse um valor intermédio ao dos dois lotes. Segundo Dhillona et al., (2012) os teores de cinza para o bagaço de maçã estão muito próximos dos obtidos ($0,23-1,14$) %.

Em relação às farinhas, verifica-se que a farinha obtida pela secagem a 40 °C tem um teor de cinza equivalente ao do bagaço, 1,77%, no entanto a farinha obtida pela secagem a 60 °C apresentou um valor de cinzas (2,22%).

11.1.5. Determinação da Fibra Dietética

Analisando os resultados obtidos, o lote de bagaço em estudo apresentou 65,78% e 4,95% de fibra dietética insolúvel e solúvel, respetivamente. Russo, (2012) no seu estudo obteve para um lote de bagaço de maçã constituído pelas variedades 50% Gala, 60% Golden, 10%

Starking e 10% Reineta, valores de $72,26 \pm 1,1\%$ e $9,22 \pm 2,80\%$ para fibra dietética insolúvel e solúvel, respetivamente. O lote estudado por Russo, (2012) apresenta teores de fibra dietética ligeiramente mais elevados. Note-se que a variação dos teores de fibras dietéticas encontrados entre estes dois estudos pode ser consequência do tipo de armazenamento e também das variedades de maçãs presentes em ambos os lotes. Enquanto o bagaço do presente estudo foi obtido de maçãs diretamente retiradas do pomar, aquele estudado por Russo, (2012) foi obtido de maçãs armazenadas em câmaras frigoríficas. Desta forma, sugere-se que o armazenamento das maçãs possa também ser um fator importante no conteúdo de fibras dietéticas do bagaço resultante.

Figuerola et al., (2005) relatam que o teor de fibra dietética solúvel do bagaço de maçã obtido a partir das variedades Granny Smith e Royal Gala encontram-se entre 4,14-14,33% e a insolúvel entre 56,5-81,6%, valores que enquadram os aqui obtidos, apesar de as variedades serem diferentes. Estes valores elevados de fibras dietéticas demonstram que o bagaço de maçã é um subproduto com um elevado teor em fibra dietética.

11.1.6. Determinação da Matéria Gorda

Os valores médios e os respetivos desvios padrão obtidos na determinação da matéria gorda da amostra de bagaço e de farinhas, expresso em percentagem na base seca, encontram-se representados na Figura 30. Verifica-se que o bagaço de maçã contém um valor médio de matéria gorda de $2,04 \pm 0,52\%$. Este valor encontra-se tendencialmente abaixo dos resultados obtidos por Ramoa, (2014), que apresentou teores de matéria gorda de 2,62% e de 2,74%, para bagaço obtido a partir de uma composição de matéria-prima e armazenamento semelhantes ou com armazenamento distinto ao utilizado neste trabalho, respetivamente. Segundo Sudha et al., (2007) as percentagens de gordura total para bagaços de maçãs encontram-se entre 1,4-2,7%, o que se verifica no lote em estudo, considerando-se aceitável o teor de gordura total

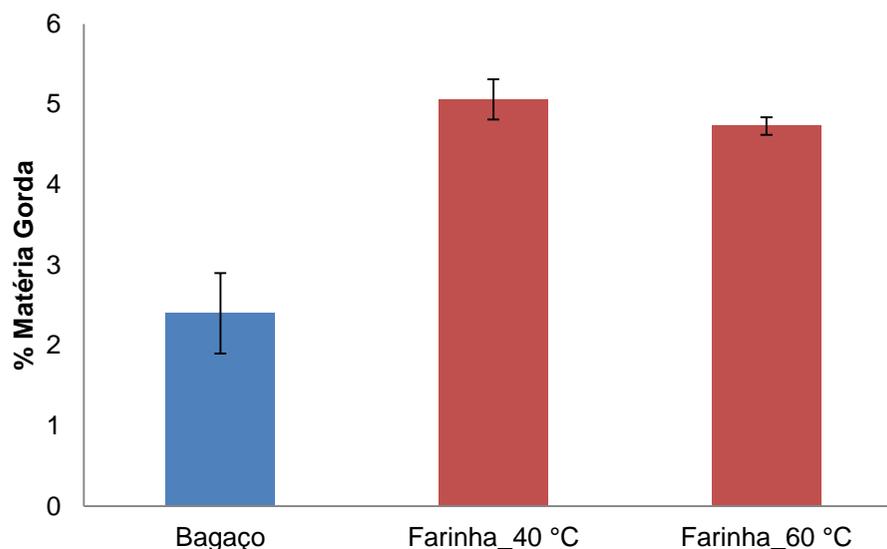


Figura 30-Conteúdo em gordura expresso em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas.

Analisando o teor de matéria gorda das farinhas, verifica-se que estas contêm mais gordura que o bagaço em estudo, sendo que a farinha obtida pela secagem do bagaço a 40 °C apresentou um teor de matéria gorda de $5,06 \pm 0,25\%$ e a farinha obtida pela secagem a 60 °C apresentou $4,73 \pm 0,11\%$. Tais resultados podem ser consequência do fato das farinhas se encontrarem trituradas ao contrário do bagaço. Assim, as farinhas são uma mistura de todos os constituintes do bagaço triturados, incluindo as sementes que podem contribuir para um aumento do teor de gordura das farinhas.

O conteúdo de gordura total das farinhas é superior ao encontrado em literatura. Segundo Coelho et al., (2010), o teor de gordura apresentado para uma farinha de bagaço de maçã foi de 1,31 g /100 g. No entanto o valor obtido neste estudo foi um pouco elevado comparativamente à encontrada em literatura. A variação destes valores pode dever-se às variedades de maçãs dos bagaços utilizado por este autor, pela trituração que estas sofreram, destruindo mais o material (sementes, pedúnculos) ou simplesmente por não conter a mesma quantidade de componentes existentes na maçã. O estado de maturação das maçãs e as condições de pós-colheita das maçãs a quando a formação do bagaço também podem influenciar o teor de gordura total.

11.1.7. Determinação da Proteína Bruta

Na Figura 31 são apresentados os valores médios e os respectivos desvios padrão relativos à determinação da proteína bruta, expresso em percentagem, na base seca.

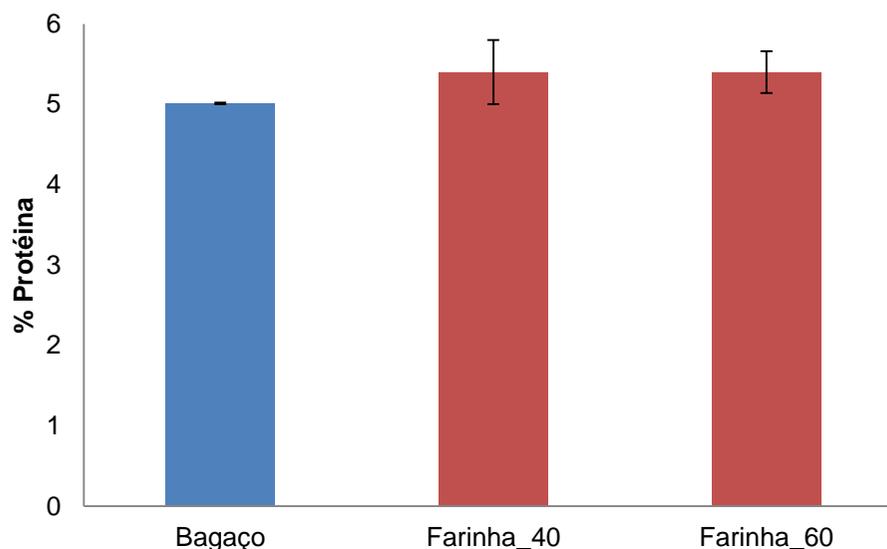


Figura 31-Conteúdo de proteína bruta expressa em percentagem, na base seca, obtido para o bagaço de maçã e farinhas.

Verifica-se que em relação ao lote de bagaço em estudo este apresentou um valor médio de $5,00 \pm 0,01\%$, que é inferior ao obtido por Russo, (2012) (7,93%), quando analisou um lote de bagaço de maçã constituído pelas variedades 50% Gala, 60% Golden, 10% Starking e 10% Reineta, mas sujeitos a armazenamento em frio. No entanto, os valores obtidos neste trabalho são próximos aos descritos por Ramoa, (2014) para dois lotes de bagaço de maçã, um constituído por 80% Golden, 10% Starking e 10% Reineta e outro por com as variedades de 10% Gala, 70% Golden, 15% Starking e 5% Reineta e apresentou valores de proteína bruta de 5,50 e 5,83%, respetivamente para cada lote. Comparando-os aos resultados obtidos, o lote em estudo pode afirma-se que os valores são muito próximos. Na literatura consultada foram encontrados valores de proteína muito dispersos. Esta discrepância de valores pode ser devida às variedades de maçãs existentes nos bagaços e que não são referenciadas em bibliografia.

A percentagem de proteína bruta das farinhas é a mesma, $5,40 \pm 0,4\%$ para a farinha obtida da secagem a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $5,40 \pm 0,26\%$ para a obtida a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes valores de percentagem de proteína total para as farinhas de bagaço de maçã não estão em concordância com Coelho et al., (2010). Segundo estes autores o teor de proteína seria apenas de 3,35 g /100 g de farinha.

11.2. Caracterização Microbiológica do Bagaço e das Farinhas.

Os valores obtidos na verificação da presença de microrganismo, nomeadamente os fungos e mesófilos a 30°C, do bagaço e das farinhas encontram-se apresentados na Tabela 8. Os resultados obtidos nesta caracterização foram comparados com a Tabela 15 que se encontra no anexo 3.

Tabela 8- Valores obtidos para o bagaço e farinhas quanto à presença de Mesófilos e Fungos.

	Bagaço	Farinha a 40 ° C	Farinha a 60 ° C
Mesófilos a 30°C (UFC/g)	8,4 x10 ³	2,4x10 ⁵	9,5x10 ²
Fungos (UFC/g)	1,2x10 ³	1,6x10 ⁴	Inferior a 10

Analisando a Tabela 8 verifica-se que os valores obtidos para os níveis populacionais de mesófilos e fungos apresentam valores baixos, verificando-se que estes resultados são considerados valores satisfatórios e aceitáveis, uma vez que se encontram abaixo de 10⁶ UFC/g/mL (valor estabelecido como limite máximo para consumo humano).

Comparando as duas farinhas em estudo verifica-se que a farinha obtida pela secagem do bagaço a 60 °C foi a que possuiu o menor nível populacional de fungos e de mesófilos, aspeto que interessa destacar visto que uma secagem a 60 °C baixa de forma clara, as populações de mesófilos e de fungos quando comparado com a farinha seca a 40 °C. Esta redução é esperada, uma vez que ao contrário da temperatura a 60 °C, a de 40 °C permite ainda o crescimento de muitos tipos de microrganismos.

Relativamente à verificação da presença de coliformes a 37 °C e *E.coli* no bagaço de maçã e nas farinhas, os valores obtidos em ambos foram inferiores a 10/g, podendo-se assim concluir que são satisfatórios.

11.3. Caracterização Microbiológica dos Extratos.

Este estudo foi efetuado com os extratos aquoso (AQ_1h_100 °C) e o etanólico (ET_2x4h_TA), de forma a perceber se ambos eram seguros para consumo Humano. Os resultados obtidos pela análise de microrganismo aos dois extratos, nomeadamente de fungos e mesófilos a 30 °C, *E. coli* e coliformes, encontram-se expressos na tabela 9

Tabela 9-Avaliação da presença dos vários microrganismos nos extratos

	AQ_1h_100 °C	ET_2X4h_TA
Mesófilos a 30 °C (UFC/mL)	3,5x10 ³	Inferior a 1
Fungos (UFC/mL)	Inferior a 1	
Coliformes a 37° (UFC/mL)	Inferior a 1	
<i>E. coli</i> (UFC/mL)	Inferior a 1	

Pela análise da tabela, verifica-se que não ocorreu crescimento das populações de *E. coli* e Coliformes a 37 °C em ambos os extratos. Estes resultados são considerados satisfatórios.

Da análise dos resultados verifica-se ainda que o padrão dos coliformes e da *E. coli* nos dois extratos é o mesmo, ou seja são satisfatórios, visto serem inferiores a 1/mL. Através dos resultados apresentados pode-se concluir que os dois tipos de extratos (etanólicos e aquosos) são seguros de ser utilizados para consumo humano, podendo assim ser adicionados como ingrediente em produtos alimentares.

11.4. Desenvolvimento do Novo Produto.

Condições da formulação

Tal como descrito na secção 10.1 de Material e Métodos, a primeira formulação de iogurte consistiu em misturar 1L de leite, 1 iogurte natural, 200g de leite em pó e 40g de açúcar com um tempo de incubação de 14h. Nestas condições verificou-se que os iogurtes obtidos possuíam uma textura com alguns grânulos. Perante estes resultados, efetuou-se uma nova formulação de iogurte na qual se diminuiu a quantidade de leite em pó para apenas 20g e se manteve as restantes quantidade dos outros ingredientes, aferindo-se de igual forma qual o melhor tempo de incubação. Foram testados três tempos de incubação diferentes, nomeadamente 8h, 10h e 12h. Após prova de todos os iogurtes obtidos (resultados não mostrados), verificou-se que o iogurte com 10h de incubação foi o que apresentou uma textura mais cremosa e um sabor mais doce. Por esta razão, definiu-se que o tempo ideal de incubação seria as 10h.

Posteriormente fez-se variar a quantidade de leite em pó e de açúcar na formulação dos iogurtes. Foi verificado que a quantidade ideal de leite em pó, tendo em conta provas sensoriais, era 10 g e a de açúcar 40 g. Tal como mostra a Tabela 6, a formulação final dos iogurtes designada como formulação 6, é de 1L de leite, 1 iogurte natural, 20g de leite em pó e 10g de açúcar, usando um tempo de incubação de 10h.

Análise sensorial

Após estabelecimento das condições da formulação de iogurtes, foi realizada uma prova sensorial aos iogurtes com incorporação de extratos aquosos e etanólicos, com o objetivo de verificar se a incorporação dos extratos nos iogurtes teriam uma boa aceitabilidade no painel de provadores, ou seja, se os extratos provocariam alguma característica organoléptica negativa ou positiva ao iogurte. Os resultados obtidos dessa prova encontram-se representados na Figura 32.

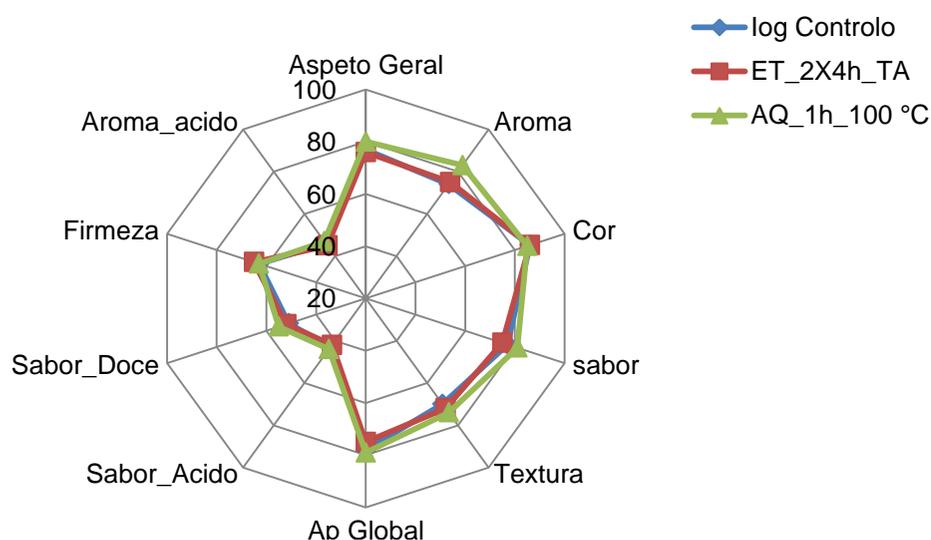


Figura 32- Resultados obtidos da análise sensorial realizada aos iogurtes com incorporação de extrato aquoso (AQ_1h_100 °C) e etanólico (ET_2X4h_TA).

Perante os resultados obtidos verificou-se que o iogurte com incorporação do extrato aquoso apresentou uma melhor aceitação comparativamente ao iogurte com incorporação do extrato etanólico, demonstrando que a incorporação do extrato aquoso não conferia nenhuma característica desagradável ao iogurte.

Posteriormente foi ainda efetuada uma prova sensorial com o intuito de verificar de entre os extratos aquosos (AQ_1h_100 °C e AQ_10_100°C), qual o mais adequado a incorporar no iogurte. Os resultados obtidos nesta segunda prova sensorial encontram-se ilustrados na Figura 33.

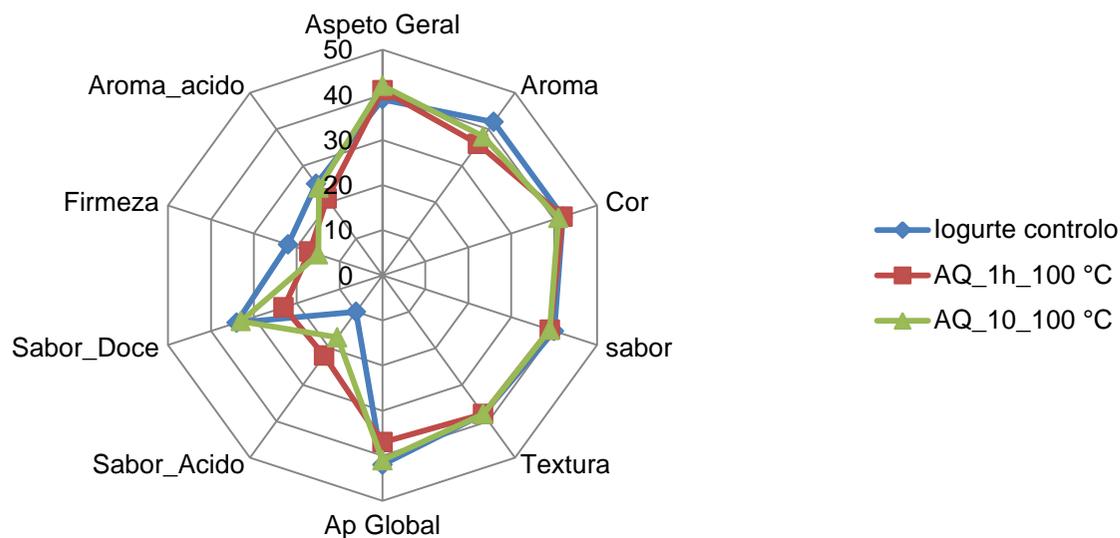


Figura 33- Resultados obtidos da análise sensorial realizada com diferentes extratos aquosos (AQ_1h_100 °C e AQ_10_100°C).

Como se pode observar, a incorporação dos vários extratos nos iogurtes provocaram diferentes avaliações. O iogurte com incorporação do extrato AQ_10_100 °C, foi o que obteve uma melhor avaliação pelo painel de provadores, seguido do iogurte com extrato AQ_1h_100 °C. Tendo em conta estes resultados, decidiu-se de forma indicativa que o extrato a incorporar nos iogurtes seria o extrato obtido por extração aquosa durante 10 min, em alternativa ao extrato obtido por extração aquosa durante 1 h. Tendo em vista o melhoramento das propriedades bioativas desse extrato, obtiveram-se novos extratos (AQ_4X10, AQ_5X10 e AQ_6X10) por 4, 5 ou 6 repetições da extração aquosa de 10 minutos, considerando-se em seguida as propriedades antioxidantes dos mesmos.

Atividade Antioxidante.

Os extratos obtidos por repetição de extração aquosa durante 10 min foram analisados quanto à sua atividade antioxidante, demonstrando que o extrato AQ_6x10 era o que tendencialmente apresentava valores mais elevados, seguindo-se o extrato AQ_5x10 e por último o extrato AQ_4x10. Os valores obtidos encontram-se representados na Tabela 10.

Tabela 10- Valores de atividade antioxidante, para os diferentes extratos obtidos através do método ABTS

Tipo de Extrato	Atividade Antioxidantes ($\mu\text{mol TE/g}$)*
AQ_4x10	4,03 \pm 0,92
AQ_5x10	4,08 \pm 1,43
AQ_6x10	5,00 \pm 1,28

*os valores apresentados são expressos em médias obtidas de ensaios em triplicado +/- desvio padrão

Note-se que o extrato aquoso AQ_6x10 possuía uma atividade antioxidante de 5,00 \pm 1,28 $\mu\text{mol TE/g}$ amostra, que poderá estar associada ao seu conteúdo em compostos fenólicos, que foi avaliado em 221,42 \pm 0,734mg EAG /100 g de extrato (massa seca).

O valor de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante dos extratos é dependente de muitos fatores (ex utilização de metodologias de extração distintas, as práticas laboratoriais utilizadas, os bagaços utilizados nos diversos estudos serem diferentes, o estado de maturação das maçãs a quando a produção do bagaço, e as diferentes variedades e quantidades das maçãs utilizadas, entre outros) e por essa razão se encontram valores muito variáveis na literatura.

O valor de compostos fenólicos totais aqui encontrados neste trabalho para o extrato AQ_6x10 é superior ao encontrado por Ferrandin, (2014) para um extrato aquoso (177,2 mg EAG /100 g). Por outro lado, Aguedo et al., (2012), descreveu valores de compostos fenólicos de 449 \pm 0,29 mg EAG/ 100 g (peso seco) para um extrato de acetona: água (70:30, v/v), enquanto Suarez et al. (2010) obteve valores de 648 \pm 0,29 mg EAG /100 g e 363 \pm 0,02 mg EAG /100 g para extratos de bagaço de maçã obtidos com acetona e metanol, respetivamente. No geral, estes resultados parecem sugerir que a água é um sistema menos eficiente do que os álcoois ou acetona na extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã (Ferrandin, 2014).

Segundo Soares et al., (2008), um extrato do bagaço de maçã obtido com acetona e água (75:25) possui cerca de 4,83 \pm 0,30 $\mu\text{mol TE/ g}$ de bagaço. Comparando os valores obtidos de atividade antioxidante para o bagaço de maçã em estudo verifica-se que este último valor se encontra muito próximo do obtido. Por outro lado Ferrandin, (2014) verificou que a atividade antioxidante média para o bagaço de maçã foi de 28,16 \pm 3,18 $\mu\text{mol TE/g}$. Apesar de alguns valores não serem concordantes com os encontrados em bibliografia, pode considerar-se o extrato de bagaço aquoso como um produto com atividade antioxidante (Dhillon et al., 2013).

Note-se ainda que extrações com a utilização sequencial de vários solventes (ou mistura de solventes) permite uma melhor separação/extração dos compostos fenólicos, quando

comparada com apenas a utilização de um solvente (ou mistura de solventes). Kalinowska et al., (2014) verificou que a utilização da mistura de três solventes (acetona: água: ácido acético) originou um extrato de casca de maçã com maiores quantidades de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana do que um extrato obtido após a extração apenas com etanol: água (ou metanol: água).

Os três extratos obtidos por repetição de extração aquosa por 10 min (AQ_4X10, AQ_5X10 e AQ_6X10) foram incorporados em iogurtes e a sua atividade antioxidante foi avaliada através do método ABTS. A Figura 34 mostra a atividade antioxidante dos iogurtes com incorporação dos vários extratos e do iogurte controlo.

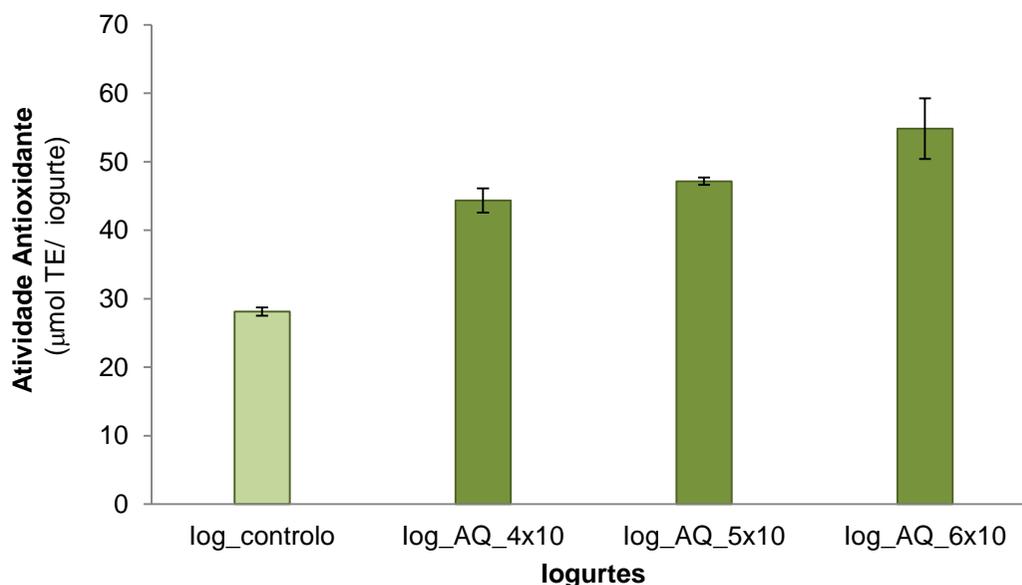


Figura 34- Gráfico representativo da atividade antioxidante dos iogurtes com incorporação dos vários extratos e do iogurte controlo.

Relativamente à atividade antioxidante dos iogurtes, por observação da Figura 34, verifica-se que o iogurte fortificado com o extrato de bagaço de maçã com maior % de atividade antioxidante foi aquele que foi fortificado com o extrato AQ_6x10. Este iogurte possui uma atividade antioxidante superior às dos iogurtes com extratos AQ_4x10 e AQ_5x10 e aproximadamente o dobro da atividade antioxidante daquela apresentada pelo iogurte controlo. A atividade antioxidante mais elevada do iogurte fortificado com o extrato AQ_6X10 pode dever-se ao elevado poder antioxidante que o extrato de bagaço de maçã contém. A incorporação deste extrato no iogurte fez com que se obtivesse um alimento com um atividade antioxidante superior ao do iogurte controlo. É de referir que alimentos com elevada atividade antioxidantes são benéficos para a saúde.

Atendendo a estes resultados, o extrato AQ_6x10 foi o selecionado para a formulação final dos iogurtes, para os quais são em seguida apresentados os resultados da avaliação do crescimento das leveduras lácticas durante o processo de fabrico dos iogurtes, bem como das suas características químicas e da avaliação sensorial do produto final.

11.5. Metodologias microbiológicas aos iogurtes.

Avaliação do crescimento das bactérias lácticas

Pelo método de Breed foi possível avaliar o crescimento das bactérias lácticas ao longo do processo de fabrico dos iogurtes. Na tabela 11 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 11- Avaliação do crescimento das leveduras lácticas ao longo do fabrico dos iogurtes.

Tipo de iogurte	Tempo (h)	N/mL
Controlo	0	2,1E+07
	3	4,5E+07
	6	5,3E+07
	10	7,3E+07
Extrato	0	1,8E+07
	3	4,0E+07
	6	5,9E+07
	10	6,1E+07

A representação gráfica dos valores obtidos encontra-se apresentada na Figura 35.

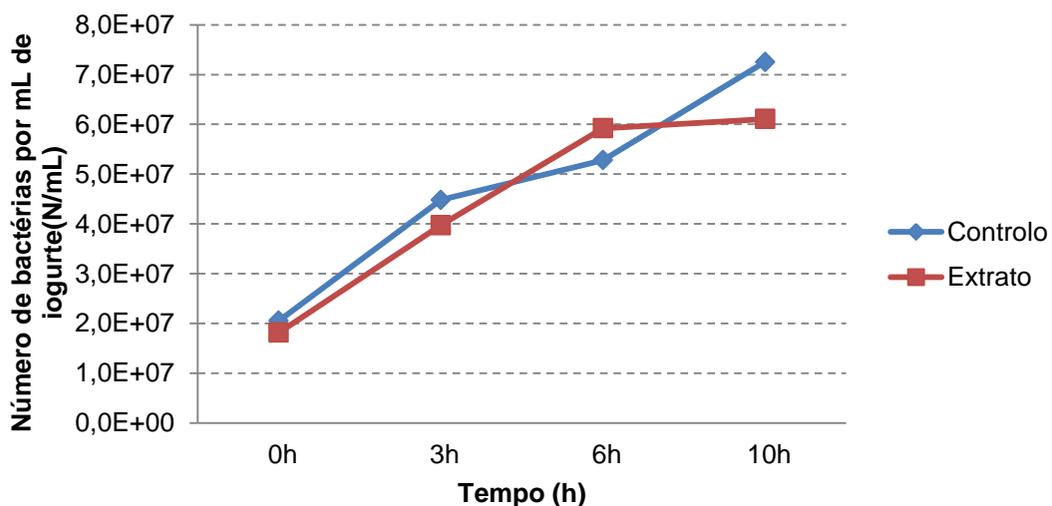


Figura 35- Representação gráfica da avaliação do crescimento das bactérias lácticas ao longo do fabrico dos iogurtes.

Como se pode verificar, ao longo da produção de ambos os iogurtes, as bactérias lácticas (Figura 36) evoluíram de forma positiva, observando-se um crescimento. No caso do iogurte fortificado com extrato, verificou-se que o crescimento das leveduras começou a estabilizar entre as 6 e as 10 horas de fabrico, o que pode significar que o iogurte estaria finalizado. Outro motivo pode ser devido à atividade antimicrobiana que o extrato pode ter conferido ao iogurte e deste modo inibir o crescimento microbiano. Por outro lado, no iogurte controlo as leveduras lácticas continuaram a multiplicar-se durante as 10 horas de fabrico, não se observando uma estabilidade no número de leveduras por mililitro deste iogurte.

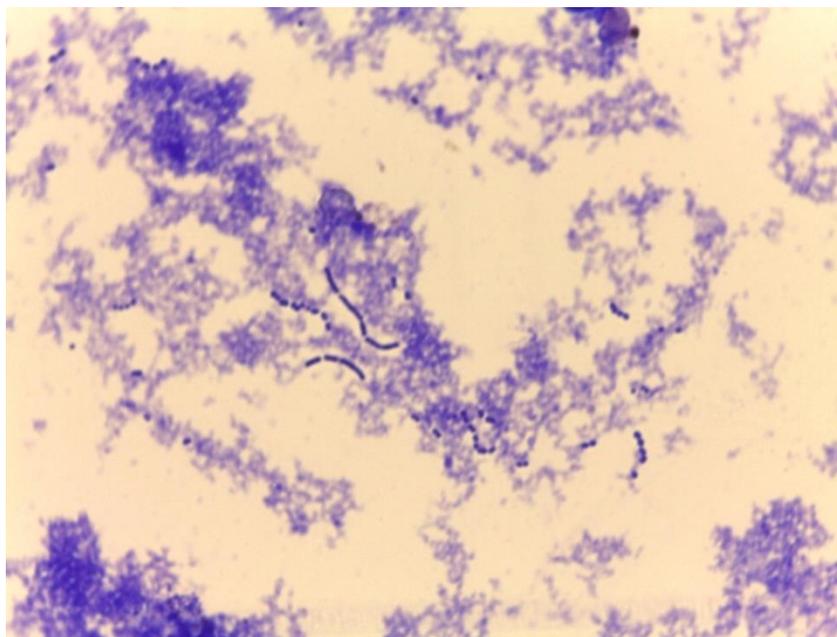


Figura 36- Bactérias lácticas presentes nos iogurtes em estudo

Note-se que o crescimento microbiano está dividido em várias fases: inicialmente ocorre uma adaptação, seguindo-se uma fase exponencial de crescimento onde as células se multiplicam em grande quantidade e posteriormente surge uma fase estacionária e por último ocorre a morte celular (Figura 37). Se compararmos as duas curvas das figuras anteriores verifica-se que as leveduras dos iogurtes apresentam as fases de crescimento nomeadamente as fase exponenciais e estacionarias, mostrando que as leveduras lácticas se encontravam em crescimento.

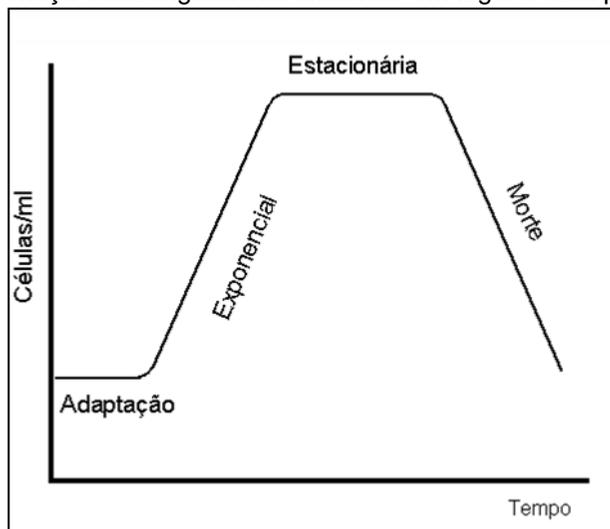


Figura 37- Curva de crescimento de bactérias. Fonte ([https:// web.fe.up.pt](https://web.fe.up.pt))

11.6. Caracterização Química dos iogurtes

Na tabela 12 encontram-se os valores obtidos na caracterização química dos iogurtes

Tabela 12- Valores obtidos na caracterização química dos iogurtes e respetivo desvio padrão (DP).

	Tipo de iogurte	
	iogurte Controlo	iogurte Extrato
pH	4,10	3,95
Acidez (% ácido málico)	0,96±0,0	0,93±0,0
Açúcares Totais (%)	6,5±0,64	6,42±0,26
Cinza (%)	0,75±0,00	0,74±0,00
Proteína Bruta (%)	4,00±0,40	3,83±0,44
Humidade (%)	84,97±0,00	89,64±0,00
Fibra Bruta (%)	0,01±0,00	0,2±0,00
Fenóis totais (mg EAG/ 100 g)	7,83±2,09	12,41±1,69
Atividade Antioxidante (µmol TE/g)	28,13±0,6	54,84±4,4

Valores expressos: média ±desvio padrão e em base húmida.

Analisando os valores obtidos para a acidez, verifica-se que o iogurte com a incorporação do extrato de bagaço de maçã AQ_6x10 contém uma menor acidez (0,93±0,00%), do que o iogurte controlo (0,96±0,00%). No entanto estes valores de acidez encontram-se muito próximos dos descritos por Silva et al., (2012), que afirmam que a faixa ideal de acidez para um iogurte se encontra entre 0,7 a 0,9%. Karaaslan et al., (2011) apresentaram valores de acidez láctica compreendidos entre 0,95-1,04 %, resultados que também estão de acordo com os obtidos para ambos os iogurtes obtidos neste trabalho.

Os valores de pH obtidos foram de 4,10 e 3,95 para o iogurte controlo e com extrato, respetivamente. Estes resultados encontram-se próximos dos valores apresentados por Silva et al., (2012) que mostra um valor de pH para iogurtes compreendido entre 3,57-4,01. Rodas et al., (2001) defendem que o valor de pH para um iogurte deve-se encontrar entre 3,5 a 4,3 pois é neste intervalo que as bactérias lácticas se desenvolvem normalmente. Karaaslan et al., (2011) no seu estudo obtiveram valores de pH entre 4,22-4,28, que são resultados mais elevados do que os obtidos para os dois iogurtes aqui em estudo. O pH é um parâmetro importante, uma vez que o iogurte com baixa acidez (pH <4,6) favorece a separação do soro, porque o gel não foi suficientemente formado. Por outro lado, em pH <4,0 ocorre a contração do coágulo devido à redução da hidratação das proteínas, ocasionando também o dessoramento do produto (Silva et al., 2012).

Relativamente à percentagem de açúcares totais presentes nos iogurtes, verificou-se que o iogurte controlo e o iogurte com o extrato de bagaço incorporado possuem aproximadamente a mesma quantidade de açúcares totais: $6,50 \pm 0,64\%$ e $6,42 \pm 0,26\%$, respetivamente. Relacionando os valores obtidos com os encontrados na Tabela 5 (composição nutricional do iogurte natural), verifica-se que estes já se encontram mais próximos do valor apresentado (5 g/100 g, ou seja 6 g/por iogurte). Por outro lado, a comparação destes valores com os encontrados em rótulos de iogurtes naturais comerciais (Figura 38) permite concluir que os iogurtes produzidos neste trabalho contêm um teor em açúcares totais um pouco mais elevado, uma vez que foi adicionado açúcar à formulação e como o extrato também já continha açúcar. Segundo a Figura 38, um iogurte comercial possui apenas na sua composição nutricional cerca de 4,8g /iogurte. Se comparamos ainda os açúcares de um iogurte com pedaços (Figura 39), verifica-se que os iogurtes confeccionados neste estudo contêm valores mais baixos.

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL (valores médios)	Por 100g	Por unidade de 120g	% DR* por unidade
Energia (kJ/kcal)	243/58	291/69	4
Lipídios (g)	2,9	3,5	5
dos quais ácidos gordos saturados (g)	1,8	2,1	11
Hidratos de carbono (g)	4,0	4,8	2
dos quais açúcares (g)	4,0	4,8	6
Proteínas (g)	3,2	3,8	7
Sal (g)	0,13	0,15	3
Cálcio (mg)	120 (15%**)	144 (18%**)	-

*DR - Doses de Referência para um adulto médio (8400kJ/2000kcal).
**VRN - Valor de Referência do Nutriente.

Figura 38- Informação nutricional de iogurte natural comercial (Marca Danone).

Os valores de humidade obtidos para os dois iogurtes estão de acordo com o encontrado na bibliografia. Segundo Fuchs et al.,(2006), o teor de humidade de um iogurte é de 86,10% podendo variar entre 87-91%, valores esses que são muito próximos aos obtidos neste estudo para os iogurtes com extrato e controlo (89,64±0,00% e 84,97±0,00%, respetivamente).

Em relação ao teor de cinzas, o iogurte controlo e o iogurte com a adição de extrato de bagaço de maçã apresentaram uma percentagem de cinza de 0,75±0,02% e 0,74±0,04% respetivamente. O iogurte com adição de extrato de bagaço de maçã contém uma menor percentagem de cinzas na sua composição nutricional. Rodas et al. (2001), num estudo semelhante, também encontraram teores de cinzas entre 0,60-0,77%, enquanto Vasconcelos (2010) apresentou valores de cinza entre 0,70-0,91%. Deste modo, os valores apresentados para ambos os iogurtes encontram-se de acordo com a literatura encontrada para este parâmetro.

Leite Fermentado Magro Batido com Pedacos de Ananas. Contem açucar (frutose) e edulcorantes. Deverá ser consumido integrado num regime alimentar variado e equilibrado e num modo de vida saudável.

INGREDIENTES: Leite pasteurizado desnatado, pedacos de ananás (8,1%), leite em pó desnatado, sumo de ananás (1,2%) à base de concentrado, frutose(1,1%), proteínas do leite, bifidobactérias e fermentos lácticos activos, aroma a ananás, edulcorantes (sucralose e acesulfame K).

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL (valores médios)	POR 100g:	POR UNID.	%DR POR UNIDADE.*
Energia	218 kJ / 51 kcal	262 kJ / 62 kcal	3%
Lípidos	0,1g	0,1g	0%
Des quais ácidos gordos saturados	0,1g	0,1g	1%
Hidratos de Carbono	7,3g	8,8g	3%
Des quais açúcares	7,1g	8,5g	10%
Fibra	0,1g	0,2g	-
Proteínas	4,5g	5,4g	11%
Sal	0,1g	0,2g	3%
Cálcio	120mg (15%**)	144mg (18%**)	-
Chumbo	100mg (12%**)	120mg (15%**)	-

*DR - Doses de Referência para um adulto médio (8400kJ/2000kcal).
**VRN - Valor de Referência do Nutriente.

Figura 39- Composição nutricional de um iogurte com pedaços de fruto (Marca Activia).

Quanto ao teor em fibra, os resultados obtidos permitiram concluir que o iogurte fortificado com extrato contém uma percentagem maior (0,2±0,00%) do que o iogurte controlo (0,01±0,00%). Perante os resultados obtidos, observa-se que esta maior percentagem de fibra bruta presente no iogurte com o extrato de bagaço é consequência da adição deste mesmo extrato ao iogurte. Segundo os valores apresentados na Tabela 5 (composição nutricional do iogurte natural), o iogurte natural não apresenta teor de fibra. Desta forma pode considerar-se o que o iogurte com extrato incorporado é um iogurte com alto teor de fibra. Comparando os valores obtidos com os valores de fibra de um iogurte comercial com pedaços de fruto na sua

composição (Figura 39), verifica-se que o iogurte produzido neste estudo possui uma quantidade de fibra equivalente na sua composição ao comercial.

Relativamente aos resultados obtidos na determinação da proteína verifica-se que o iogurte controlo e o iogurte fortificado apresentam uma percentagem de proteína de $4,00 \pm 0,40\%$ e $3,83 \pm 0,40\%$ respectivamente. Os valores de proteína obtidos encontram-se de acordo com os apresentados na tabela 5 (composição nutricional do iogurte natural). Segundo Rodas et al., (2001) os valores de proteína encontrados em iogurtes são de 2,81-3,40%, valores muito próximos aos obtidos. Também Vasconcelos, (2010) determinou o teor de proteína em iogurtes, tendo obtido valores variáveis entre 3,46-3,94%. Pode assim concluir-se que o teor de proteína obtido nos iogurtes neste estudo, possuem valores satisfatórios de proteína e concordantes com os encontrados por outros autores

Analisando os resultados obtidos para o conteúdo de compostos fenólicos, verifica-se que o iogurte fortificado com o extrato de bagaço possui uma quantidade mais elevada do que o iogurte controlo, aproximadamente o dobro dos valores $12,41 \pm 1,69$ e $7,83 \pm 2,08$ mg EAG/100g de iogurte respectivamente (Tabela 12). Estes resultados eram esperados, uma vez que, o extrato de bagaço é rico em compostos fenólicos e deste modo, confere ao iogurte esta propriedade. Relativamente a valores encontrados em bibliografia, Karaaslan et al., (2011) estudou o efeito da incorporação de extratos etanólicos de diferentes variedades de uvas em iogurtes e obteve iogurte com teores de compostos fenólicos compreendidos entre $6,819 \pm 0,42$ - $7,723 \pm 0,53$ mg EAG/100g. Deste modo o enriquecimento de alimentos com extratos de alimentos ricos em compostos fenólicos pode ser uma estratégia promissora para a produção de alimentos funcionais que apresentam uma maior atividade antioxidante (Karaaslan et al., 2011). Os mesmos autores defendem que a suplementação de iogurtes com extratos de alimentos ricos em compostos fenólicos iria oferecer um novo caminho para introdução de fitoquímicos biologicamente ativos na dieta humana

Análise sensorial

No final do processo de idealização do novo produto alimentar foi realizada uma prova sensorial ao iogurte final.

Nesta prova foi apresentado aos provadores a três iogurtes, um iogurte sem extrato (Controlo), um iogurte comercial natural e o iogurte com o extrato AQ_6x10 incorporado.

Perante os resultados obtidos, na Figura 40 verifica-se que o iogurte com o extrato de bagaço foi muito bem aceite pelo painel de provadores, melhor até que o iogurte comercial e que

o iogurte controlo, apesar de o iogurte com extrato possuir características muito semelhantes à do iogurte controlo. Comparando os três iogurtes, o iogurte comercial foi considerado mais ácido, e conseqüentemente menos doce que os iogurtes controlo e com extrato. Os iogurtes controlo e com extrato foram considerados mais cremosos, com um aroma mais agradável e obtiveram uma melhor apreciação global que o iogurte comercial.

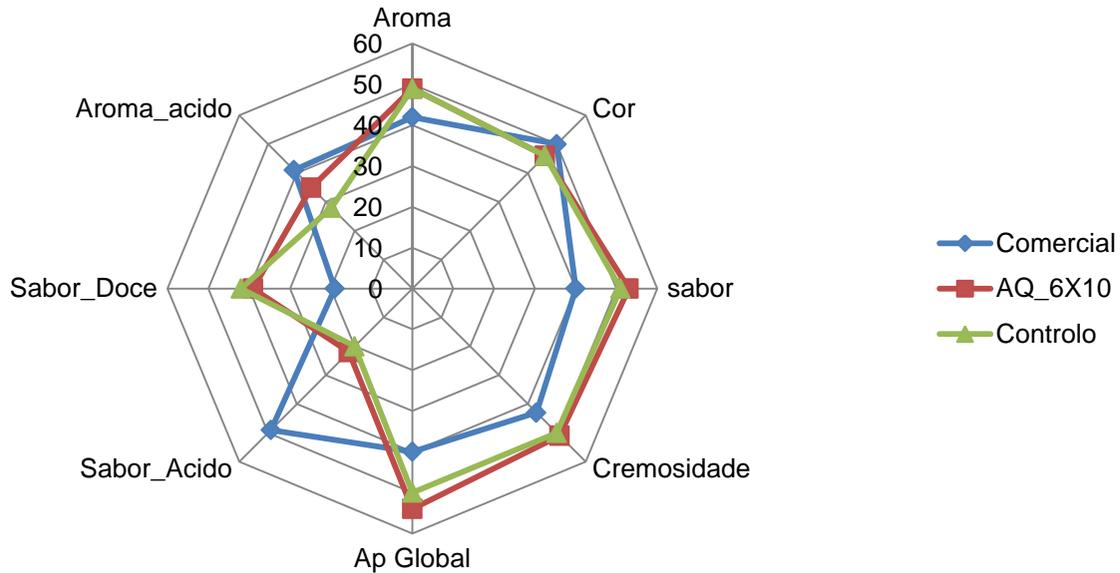


Figura 40- Resultados obtidos da análise sensorial realizada ao iogurte final com incorporação do extratos AQ_6x10, ao iogurte controlo e ao iogurte comercial.

Foi ainda questionado aos provadores qual dos três iogurtes elegeriam como preferido, ou seja, aquele que na opinião do painel possuía as características sensoriais ideais. Os resultados encontram-se representados na Figura 41, onde se observa que o iogurte com o extrato de bagaço de maçã foi o escolhido pelo painel de provadores.

■ log Comercial ■ log. Controlo ■ log. Extrato AQ_6X10

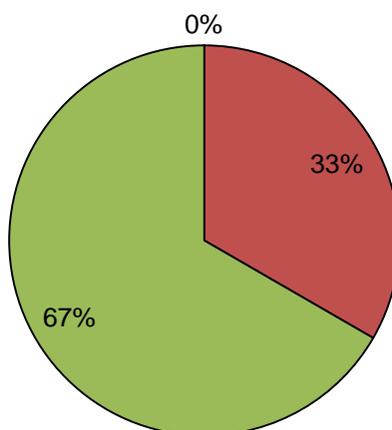


Figura 41- Preferência do painel de provadores perante os três iogurtes apresentados.

V. Conclusões

12. Conclusões

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo desenvolver um novo alimento, um iogurte natural, enriquecido com um extrato obtido a partir de bagaço de maçã, que é um subproduto da indústria agroalimentar com elevado potencial, uma vez que contém propriedades e componentes que podem contribuir de forma benéfica para a saúde, tais como alto teor em compostos fenólicos, atividade antioxidante e fibra dietética.

Os resultados obtidos na caracterização química do bagaço de maçã, nomeadamente a acidez, açúcares redutores e totais, cinza, matéria gorda, humidade, proteína bruta, fibra dietética solúvel e insolúvel encontram-se de acordo com os valores encontrados na literatura. Conclui-se que este subproduto possui uma elevada quantidade de fibra dietética insolúvel 65,8% e 4,9% de fibra dietética solúvel, $15,96 \pm 1,53\%$ de açúcares totais, $2,0 \pm 0,01\%$ de acidez; $5,01 \pm 0,01$ de proteína bruta e $2,40 \pm 0,50\%$ de matéria gorda, na sua constituição química, na base seca.

Relativamente ao extrato aquoso do bagaço de maçã (AQ_6X10) usado na formulação otimizada para o iogurte enriquecido, os resultados obtidos permitiram concluir que a atividade antioxidante é de $5,00 \pm 1,28 \mu\text{mol TE/ g}$ bagaço. Em relação aos compostos fenólicos, possui na sua composição 41,67 g EAG/100g bagaço (massa húmida). Ao nível microbiológico, verificou-se que o extrato aquoso AQ_6X10 apresentava níveis baixos (inferiores a 1/mL) de fungos, mesófilos a 30 °C, coliformes e *E. coli*, sendo portanto aceitável para utilização como ingrediente alimentar.

Quanto às farinhas obtidas a partir do bagaço de maçãs, estas apresentaram características químicas aceitáveis e com elevado potencial podendo, em trabalhos futuros, serem incorporadas em alimentos. Mostraram possuir um teor de gordura mais elevado que o bagaço em estudo, pois no caso das farinhas encontrando-se mais finas que o bagaço foi mais fácil de extrair a gordura que no bagaço. Este valor mais elevado não significa que estas possuam mais matéria gorda que o bagaço. Os restantes parâmetros químicos analisados encontram-se na mesma ordem de grandeza do bagaço de maçã. As farinhas também demonstraram valores microbiológicos aceitáveis não apresentando a presença de microrganismos.

Os iogurtes apresentaram resultados de parâmetros químicos analisados semelhantes ao de iogurtes comerciais e em concordância com os valores encontrados em bibliografia. Avaliou-se o crescimento das bactérias lácticas ao longo do processo de fabrico dos iogurtes utilizando-se o método de Breed, tendo-se concluído que as leveduras lácticas se desenvolveram normalmente ao longo do processo de fabrico. O iogurte com a incorporação do extrato revelou elevado teor em

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

compostos fenólicos (12,41 g EAG/100g), aproximadamente 1,6 vezes superior ao iogurte controle, e elevada atividade antioxidante (54,84 $\mu\text{mol TE/g}$), 2 vezes superior ao iogurte controle, demonstrando que o consumo deste iogurte poderá vir a ser benéfico para a saúde do consumidor

A análise sensorial realizada demonstrou uma boa aceitação do iogurte fortificado com o extrato de bagaço de maçã por parte do painel de provadores.

Este estudo demonstrou que os subprodutos da indústria agroalimentar como o bagaço de maçã têm um elevado potencial, revelando ser uma boa fonte de compostos bioativos, elementos importantes para a dieta, e para a prevenção de doenças. Verificou-se que os produtos obtidos a partir do bagaço, nomeadamente o extrato aquoso permitiu produzir um novo iogurte, com propriedades que podem ser consideradas benéficas para a saúde humana.

VI. Referências Bibliográficas

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

Norma Portuguesa: NP 1421 Determinação da acidez, 1977. Official Methods of Analysis - A.O.A.C., 15th Edition, Kenneth, USA, 1990

Norma Portuguesa: NP 1420 Determinação dos açúcares totais, dos açúcares redutores e dos açúcares não redutores (sacarose) Técnica de Luff-Schoorl. 1987 Official Methods of Analysis -A.O.A.C., 15th Edition, Kenneth, USA, 1990

Norma Portuguesa NP 460 Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas (Método de Breed) 1985

Norma Portuguesa NP 704 Determinação do teor de açúcares totais. Técnica de Munson e Walker. Iogurte e outros leites fermentados, 1994

ISO 16649 - 2 (2001) - Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Colony-count method at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D- glucuronide

Norma Portuguesa NP:4405 (2002) e ISO 4833 (2003) – Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms by colony-count technique at 30 °C)

ISO 4832 (2006) - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coliforms --Colony-count technique.

ISO 21527 - 1 (2008)- Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds by colony count technique.

Aguedo, M.; Kohne, S.; Rabetafik, N.; Bossche, S. V.; Sterckx, J.; Blecker, C.; Beauve, C.; Paquot, M., 2012. Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products. *Journal of Food Composition and Analysis* 27, 61–69.

Ajila, C.M.; Leelavathi, K.; Prasada Rao, U.J.S., 2008. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science* 48, 319-326.

Alberti, A., 2014. Compostos fenólicos da maçã: extração, perfil e classes fenólicas, atividade antioxidante, processamento e avaliação termoanalítica. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Almeida, D.P.F.; Pintado, M. ; Malcata, F. X., 2008. Valor nutritivo e composição fitoquímica de variedades de maçãs de Alcobaça. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa, 1-6

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis (K. Helrich, Ed.). AOAC Int., Arlington, VA

Balascio, C. C.; Bern, C. J.; Charles R. Hurburgh Jr.,C.R.,1989. Effect of Humidity Ratio on Corn Moisture Content as Determined by the Air-Oven Agricultural and Biosystems Engineering 35, 1716-1719.

Borges, L. L.; Lúcio, T. C.; Gil, E. S.; Barbosa, E. F., 2011. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopedia Biosfera* , *Centro Científico Conhecer* 7, 1-20.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. ; Berset. C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28, 25-30.

Brunt, K.; Sanders, P. 2013. Improvement of the AOAC 2009.01 total dietary fibre method for bread and other high starch containing matrices. *Food Chemistry* 140, 574–580.

Coelho, L.M., Wosiack, G. 2010. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30, 582-588.

Colin-Henrion,M.; Mehinagic,E.; Renard, C.M.G.C.; Richomme, P.; Jourjon, F. 2009. From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chemistry* 117, 254–260.

Côrte-Real, D. C.C., 2009. Efeito da maceração pré - fermentativa a frio da aplicação de taninos enológicos na vinificação de tinto. Estudo em plantas jovens. Dissertação de Mestrado, Lisboa.

Dhillon, G. S.; Kaur, S.; Brar, S.K., 2013. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 789–805.

Dhillon, G.S.; Kaur,S.; Brar, S.K. ;Verma,M.,2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 38, 6-13.

Ferrandin, G., 2014. Avaliação do potencial antioxidante e produção de fermentado alcoólico a partir do bagaço de maçã. *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ferreira, D.; Guyot, S. ; Marnet, N.; Delgadillo, I.; Renard, C.M.G.C ; Coimbra, M.A., 2002. Sun-Drying, Composition of Phenolic Compounds in a Portuguese Pear (*Pyrus communis* L. Var. S. Bartolomeu) and Changes after. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 50, 4537–4544.

Figuerola, F.; Hurtado, M. L.; Estevez, A.M. ; Chiffelle, I. ; Asenjo, F., 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry* 91, 395–401.

Flambó, D.F.A.L.P., 2013. Atividades Biológicas dos flavonoides: Atividade Antimicrobiana. Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Porto.

Fuchs, R.H.B.; Tanamati, A.C.; Antonioli, C.M.; Gasperello, E.A.; Doneda, I., 2006. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. *Boletim Ceppa* 24, 83-98.

Fujihara, B. T.; Destro, M. O. ; Magaldi, T. D. ; Silva, A. M., 2014. Produção do iogurte. // *Simpósio de assistência Farmacêutica*.

Garcia, Y. D.; Valles, B. S. ; Lobo, A. P., 2009. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry* 117, 731–738.

Gonçalves, F.; Lemos, E. T., 2012. Métodos instrumentais de análise II. *Escola Superior Agrária de Viseu. Componente Prática Laboratorial*, 15-17.

Gonçalves, C. R.; Leão, M. F., 2013. Produção de iogurte com adição de farinhas mistas a partir de resíduos de maçã, maracujá e uva. *Enciclopédia Biosfera, Centro científico conhecer* 9, 3618.

Gorinstein, S.; Zachwieja, Z.; Folta, M.; Barton, H.; Piotrowicz, J.; Zemser, M.; Weisz, M.; Trakhtenberg, S.; Martin-Belloso, O., 2001. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 952-957.

Grigoras, C. G.; Destandau, E. ; Fougère, L.; Elfakir, C., 2013. Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products* 49, 794– 804.

Guiné, R., 2012. Projeto de uma indústria de processamento de néctares de maçã e pêra. *Millenium* 42, 175-189.

Joshi, V.K.; Attri, D., 2006. Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products. *Natural Product Radiance* 5, 289-296.

Kalinowska, M.; Bielawska, A.; Lewandowska-Siwkiewicz, H. ; Priebe, W. ; Lewandowski, W.,2014. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 84, 169-188.

Karaaslan, M.; Ozdin, M. ; Vardin, H. ; Turkiglu, H., 2011. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *Food Science and Technology* 44, 1065-1072.

Kołodziejczyk, K.; Markowski, J.; Kosmala, M.; Kró, B.;Płocharski,W., 2007. Apple pomace as a potential source of nutraceutical products. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57, 291-295.

Lee, S. C.; Prosky, L. ; DeVries, J. W., 1992. "Determination of total, soluble, and insoluble, dietary fiber in foods - enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 75, 395-416.

Lemos, E., 2011. *Métodos Instrumentais de Análise I. Componente teórica*. Escola Superior Agrária de Viseu.

Lemos, E. T.; Gonçalves, F. J., 2014. *Sebenta de apoio à componente prática de Análise de Alimentos I*. Escola Superior Agrária de Viseu.

Linskens, H.F.; Jackson, J.F., 1999. *Materials, Analysis of Plant Waste*. Springe.

Lobo, A. P.; Sanchez, Y. D; Garcia, J. M. ; Madrera, R. R. ; Valles, B.S., 2009. Phenolic and antioxidant composition of cider. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 644–648.

Macagnan, F. T.; Santos, L. R.; Roberto, B. S. ; Moura, F. A. ; Bizzani, M. ; Silva, L. P., 2015. Biological properties of Apple pomace, Orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6, 1-6.

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

Magalhães, L.M.; Barreiros, L.; Reis, S.; Segundo, M.A., 2014. Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 187–194.

Mahawara, M.; Singh, A.; Jalgaonkar, K., 2012. Utility of apple pomace as a substrate for various products: a review. *Food and Bioprocess Processing* 90, 597–605.

Marais, J.P.J.; Deavours, B.; Dixon, R.A.; Ferreira, D., 2008. "The Stereochemistry of Flavonoids. 1, 1-47. in *The Science of Flavonoids*, de Erich Grotewold, 273. Ohio: Springer

Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J., 2002. Revisión: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria* 17, 271-278.

Mathias, T.R.S., 2011. Desenvolvimento de iogurte sabor café: avaliação sensorial e reológica. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro.

Mendes, A. R., 2011. Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar. *Dissertação de Mestrado em Química Forense*, Coimbra.

Menrad, K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering* 56, 181-188.

Momm, A.N., 2007. Efeito do bagaço de maçã sobre a glicemia, lipídemia, peroxidação de lípidos e peso corporal em ratos obesos. Dissertação de Mestrado, Ponta Grossa.

Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M.I.; Estrada-Leon, R.J.; Cuevas-Glory, L.; Estrada-Mota, I.A.; Ortiz-Vasquez, E.; Betancur-Ancona, D.; Sauri-Duch, E., 2015. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan. *Food Chemistry* 166, 17–22.

Moura, C.G., Ribeiro, F.A.P.; Lucke, G.; Gollucke, A. P. B.; Oshima, C. T. F.; Ribeiro, D. A., 2015. Apple juice attenuates genotoxicity and oxidative stress induced by cadmium exposure in multiple organs of rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 32, 7-12.

Nawirska, A.; Kwasniewska, M., 2005. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry* 91, 221–225.

Utilização de bagaço de maçã como ingrediente alimentar em iogurte com potencial efeito benéfico para a saúde

Neto, O. C. C.; Oliveira, C. A. F.; Hotta, R. M.; Sobral, P. J. A., 2005. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25, 448-453.

Pinto, A., 2015. Métodos de Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas. Práticas de Microbiologia Alimentar e Ambiental. Curso de Qualidade Alimentar e Nutrição. Escola Superior Agrária de Viseu.

Prosky, L., Asp, N.; Schweizer, T. F.; DeVries, J. W.; Furda, I., 1998. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fibre in foods and food products. Interlaboratory study. *Journal of Food Composition and Analysis* 71, 1017-1023.

Protzek, E.C.; Freitas, R.J.S.; Wasczynski, N., 1998. Aproveitamento do bagaço de maçã na elaboração de biscoitos ricos em fibra alimentar. *Boletim do Ceppa* 16, 263 – 275.

Ramoá, H.I.C.A., 2014. Avaliação de parâmetros químicos e microbiológicos de subprodutos da indústria transformadora da maçã. Trabalho Final de Curso. Escola Superior Agrária de Viseu.

Rodas, M.A.B.; Rodrigues, R.M.M.S.; Sakuma, H.; Tavares, L.Z.; Sgarbi, C.R.; Lopes, W.C.C., 2001. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21, 304-309.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Elsevier Journal* 26, 1231-1237.

Rupasinghe, H.P.V.; Wang, L.; Huber, G. M.; Pitts, N. L., 2008. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Control* 107, 1217–1224.

Russo, R.A.F., 2012. Avaliação do potencial tecnológico de um subproduto da indústria de transformação de maçã. Trabalho Final de Curso. Escola Superior Agrária de Viseu.

Saito, M.F., Rigoni, D.C.; Canteriz, M.H.G.; Petkowicz, C. L.O.; Nogueira, A.; Wosiacki, G., 2011. Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivars. *Acta Scientiarum Agronomy* 33, 383-389.

Saito, S.T., 2007. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante do chá verde brasileiro. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre.

Santos, C.A.F., 2011. Desenvolvimento de um novo produto: “Fruta com iogurte”. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Lisboa.

Santos, J. R., 2013. Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar. Lisboa.

Silva, L.C.; Machado, T. B.; Silveira, M. L. R.; Rosa, C.S.; Bertagnolli, S.M.M., 2012. Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria -RS. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde* 13, 111-120.

Simões, O.; Moreira, J.; Dinis, I.; 2008. Variedades regionais de maçãs e pêras . Estarão os consumidores interessados ? 166-177.

Singleton, V.L.; Orthofen, R .; Lamuela, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*. 299, 152-178.

Sivam, A. S.; Sun-Waterhouse, D. ; Quek, S.; Perera, C. O., 2010. Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review. *Journal of Food Science* 75, 163-174.

Soares, M.; Welter, L. ; Gonzaga, L. ; Lima, A. ; Mancini – Filho, J. ; Fett. R., 2008. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 727-732.

Staffolo, M.D.; Bertola, N.; Martino, N.; Bevilacqua, A., 2004. Influence of dietary fiber addition on sensorial and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14 263–268.

Streit, F., 2004. Estudo do Aproveitamento de Bagaço de maçã para produção de quitosana fungica. *Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos*. Florianópolis.

Suarez, B.; Alvarez, A. L.; Garcia, Y. D. ; Barrio, G. ; Del Lobo, A.P.; Parra. F., 2010. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry* 120, 339–342.

Sudha, M.L., 2011. Apple Pomace (By-Product of Fruit Juice Industry) as a Flour Fortification Strategy. *Central Food Technological Research Institute* 36, 395-405.

Sudha, M.L.; Baskaran, V.; Leelavathi, K., 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry* 104, 686–692.

Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.

Tseng, A.; Zhao, Y., 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry* 138, 356–365.

Vasconcelos, C.M., 2010. Caracterização físico-química e sensorial de um iogurte "light" com farinha de yacon (*smallanthus sonchifolius*). *Dissertação de Mestrado. Viçosa, Minas Gerais*.

Vitali, D.; Dragojevic, I. V.; Sebecic, B., 2009. Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chemistry* 114, 1462–1469.

Wegrzyn, T.F.; Farr, J.M.; Hunter, D.C.; Au, J.; Wohlers, M.W.; Skinner, M.A.; Stantey, R.A.; Sun-Waterhouse, D., 2008. Stability of antioxidants in an apple polyphenol–milk model system. *Food Chemistry* 109, 310-318.

Sites:

www.insa.pt (acedido em 8 de Dezembro de 2015).

<http://www.frusantos.com>. (acedido em 20 de Novembro de 2015).

<http://www.narcfrutas.com>. (acedido em 20 de Novembro de 2015).

“<http://www.oleosessenciais.org/>.” (acedido em 20 de Fevereiro de 2016).

“[https:// web.fe.up.pt](https://web.fe.up.pt).” (acedido em 2016 de 2 de 25)

(http://www.setor1.com.br/laticinios/iogurtes/defi_ni.htm). (acedido em 20 de Dezembro de 2015).

<http://www.fitoquimicos.com/Acido%20clorogenico.htm>

VII. Anexos

Anexo 1- Massa de açúcar invertido Extraído de NP- 1420 de 1987.

Tabela 13- Tabela necessária para determinação de açúcares totais e redutores

Solução de Tiosulfato de sódio 0,1N	Glucose, frutose ou açúcar invertido $C_6H_{12}O_6$	
$\Delta V \text{ cm}^3$	mg	Δ
1	2,4	2,4
2	4,8	2,4
3	7,2	2,5
4	9,7	2,5
5	12,2	2,5
6	14,7	2,5
7	17,2	2,6
8	19,8	2,6
9	22,4	2,6
10	25,0	2,6
11	27,6	2,7
12	30,3	2,7
13	33,0	2,7
14	35,7	2,8
15	38,5	2,8
16	41,3	2,9
17	44,2	2,9
18	47,1	2,9
19	50,0	3,0
20	53,0	3,0
21	56,0	3,1
22	59,1	3,1
23	62,2	-

Anexos 2 –Valor das massas m_1 e m_2 expressos em miligramas. Extraído da NP 704 de 1994

Tabela 14- Massa de açúcar invertido (mg).

Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido										
m_1	m_2										
50	22,3	124	56,1	198	91,1	272	127,4	346	165,1	420	204,6
52	23,2	126	57,0	200	92,0	274	128,4	348	166,2	422	205,7
54	24,1	128	58,0	202	93,0	276	129,4	350	167,2	424	206,7
56	25,0	130	58,9	204	94,0	278	130,4	352	168,3	426	207,8
58	25,9	132	59,8	206	94,9	280	131,4	354	169,3	428	208,9
60	26,8	134	60,8	208	95,9	282	132,4	356	170,4	430	210,0
62	27,7	136	61,7	210	96,9	284	133,4	358	171,4	432	211,1
64	28,6	138	62,6	212	97,8	286	134,4	360	172,5	434	212,2
66	29,5	140	63,6	214	98,8	288	135,4	362	173,5	436	213,3
68	30,4	142	64,5	216	99,8	290	136,4	364	174,6	438	214,4
70	31,3	144	65,4	218	100,8	292	137,4	366	175,5	440	215,5
72	32,3	146	66,4	220	101,7	294	138,4	368	176,7	442	216,6
74	33,2	148	67,3	222	102,7	296	139,4	370	177,7	444	217,8
76	34,1	150	68,3	224	103,7	298	140,5	372	178,8	446	218,9
78	35,0	152	69,2	226	104,6	300	141,5	374	179,8	448	220,0
80	35,9	154	70,1	228	105,6	302	142,5	376	180,9	450	221,1
82	36,8	156	71,1	230	106,6	304	143,5	378	182,0	452	222,2
84	37,7	158	72,0	232	107,6	306	144,5	380	183,0	454	223,3
86	38,6	160	73,0	234	108,6	308	145,5	382	184,1	456	224,4
88	39,5	162	73,9	236	109,5	310	146,6	384	185,2	458	225,5
90	40,4	164	74,9	238	110,5	312	147,6	386	186,2	460	226,7
92	41,4	166	75,8	240	111,5	314	148,6	388	187,3	462	227,8
94	42,3	168	76,8	242	112,5	316	149,6	390	188,4	464	228,9
96	43,2	170	77,7	244	113,5	318	150,7	392	189,4	466	230,0
98	44,1	172	78,7	246	114,5	320	151,7	394	190,5	468	231,2
100	45,0	174	79,6	248	115,4	322	152,7	396	191,6	470	232,3
102	46,0	176	80,6	250	116,4	324	153,7	398	192,7	472	233,4
104	46,9	178	81,5	252	117,4	326	154,8	400	193,7	474	234,5
106	47,8	180	82,5	254	118,4	328	155,8	402	194,8	476	235,7
108	48,7	182	83,4	256	119,4	330	156,8	404	195,9	478	236,8
110	49,6	184	84,4	258	120,4	332	157,9	406	197,0	480	237,9
112	50,6	186	85,3	260	121,4	334	158,9	408	198,1	482	239,1
114	51,5	188	86,3	262	122,4	336	159,9	410	199,1	484	240,2
116	52,4	190	87,2	264	123,4	338	161,0	412	200,2	486	241,2
118	53,3	192	88,2	266	124,4	340	162,0	414	201,3	488	242,5
120	54,3	194	89,2	268	125,4	342	163,1	416	202,4	490	243,6
122	55,2	196	90,1	270	126,4	344	164,1	418	203,5	-	-

Anexo 3- Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer

Tabela 15- Tabela com Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer. Fonte: Instituto Ricardo Jorge

Microorganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microorganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Leveduras	1* e 2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
Bolores	1* e 2	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	#
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	#
Coliformes totais	1	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1, 2	<10	NA	≥ 10	NA
	3	≤ 10	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito redutores	1, 2 e 3	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
Patogénios					
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2 e 3	$\geq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2 e 3	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $< 10^2$ #	-	$\geq 10^2$
<i>Campylobacter spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g

- *- Aplicável em produtos conservados no frigorífico
- # - Equacionado caso a caso
- NA - Não aplicável

Anexo 4- Folha de prova sensorial utilizada nas provas realizadas



Ficha de Análise Sensorial: IOGURTE

Nome: _____

Sexo: M / F

22 de junho de 2015

1. Aroma / Sabor

1. Muito Intenso	2. Intenso	3. Medianamente Intenso	4. Pouco intenso	5. Ausente
------------------	------------	-------------------------	------------------	------------

		logurte 1	logurte 2	logurte 3
Aroma	Ácido			
Sabor	Doce			
Sabor	Ácido			

2. Cremosidade

1. Muito cremoso	2. Cremoso	3. Pouco cremoso
------------------	------------	------------------

logurte 1	logurte 2	logurte 3

3. Apreciação Final

1. Muito Agradável	2. Agradável	3. Pouco Agradável	4. Desagradável	5. Muito Desagradável
--------------------	--------------	--------------------	-----------------	-----------------------

	logurte 1	logurte 2	logurte 3
Aroma			
Sabor			
Cremosidade			
Cor			
Apreciação Global			

Coloque um círculo na amostra que prefere:

1

2

3